

HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI

HELSINGIN YLIOPISTO

MAATALOUS-METSÄTIETEELLINEN TIEDEKUNTA

ELINTARVIKE- JA YMPÄRISTÖTIETEIDEN LAITOS

R1-pullotuslinjan prosessihygienian kehittäminen

Maisterintutkielma

Bioteknikka

Heikki Puhakka

2019



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution– Department Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä/Författare – Author Heikki Puhakka			
Työn nimi / Arbetets titel – Title R1-pullotuslinjan prosessihygienian kehittäminen			
Oppiaine /Läroämne – Subject Bioteekniikka			
Työn laji/Arbetets art – Level Maisterintutkielma	Aika/Datum – Month and year Huhtikuu 2019	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 68	
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p>Tämän työn tarkoituksena oli tutkia ja kehittää Altia Oyj:n Rajamäen alkoholijuomatehtaan uuden R1-pullotuslinjan prosessihygieniaa. Linjalla ajetaan pääasiassa tehtaan valmistamia matala-alkoholisia ja alkoholittomia tuotteita, joiden prosessoinnin hygieniakäytäntöjen toimivuudesta ei ole paljon tutkittua tietoa. Työssä tutkittiin lisäksi tuotteiden raaka-aineiden mikrobiologista laatua sekä pyrittiin tunnistamaan tuotteissa ja prosessissa esiintyviä mikrobeja.</p> <p>Tutkielman kirjallisuussosiossa käsitellään elintarviketeollisuuden lainsäädäntöä sekä juomateollisuuteen liittyviä mikrobiologisia riskejä erilaisten juomien ja näiden prosessoinnin näkökulmasta. Kokeellisessa osiossa pullotusprosessin mikrobiologista hygieniaa tutkittiin pääasiassa pintasivelymenetelmällä keräämällä näytteitä pullotuslinjan pinnoilta. Pullotettujen tuotteiden mikrobiologiset analyysit suoritettiin suodattamalla näytettä suodatinkalvolle. Tutkimuksessa testattiin lisäksi erilaisia mikrobien elatusalustoja ja antibiootteja bakteerien sekä hiivojen ja homeiden tunnistamista varten. Analyysissä usein esiintyvät bakteerit pyrittiin tunnistamaan sekvensoimalla bakteerien 16S rRNA-geenisekvenssit. DNA:n eristys ja PCR suoritettiin Helsingin yliopiston tiloissa ja näytteiden geenisekvensointi tapahtui Bioteekniikan instituutin toimesta. Geenisekvenssien linjaus suoritettiin NCBI:n BLAST-ohjelmalla.</p> <p>Tutkielman julkisesta versiosta puuttuu ainoastaan Altia Oyj:lle toimitetut salassa pidettävät tiedot. Tutkimustulosten perusteella R1-pullotuslinjan prosessihygienia on riittävällä tasolla, jos pullotuslinjan hygieniamenetelmiä noudatetaan. Prosessihygienianäytteissä ei huomattu merkittävää mikrobiologista kasvua käytetyillä menetelmillä. Tuotteissa huomattiin kuitenkin esimerkiksi itiöitä muodostavia bakteereja, joiden voitiin olettaa olevan peräisin tuotteiden raaka-aineista tai niiden säilöntätankeista ja putkistoista. 16S rDNA -menetelmällä onnistuttiin tunnistamaan neljä tuotteissa usein esiintynyttä bakteeria, joiden ei kuitenkaan kirjallisuuden perusteella todettu voivan pilata alkoholijuomia tai kasvaa pullotettujen tuotteiden olosuhteissa. Osa tunnistetuista bakteereista voi toimia kuitenkin merkittävänä biofilmin muodostajana.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Prosessihygienia, juomateollisuus, biofilmi, 16S rDNA			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			



HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos/Institution– Department Department of Food and Environmental Sciences	
Tekijä/Författare – Author Heikki Puhakka			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Development of process hygiene for R1 bottling line			
Oppiaine /Läroämne – Subject Biotechnology			
Työn laji/Arbetets art – Level Master's Thesis	Aika/Datum – Month and year April 2019	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 68	
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p>The aim of this thesis was to study and develop the process hygiene of the new R1 bottling line at Altia Rajamäki alcoholic beverage plant. The products bottled on the line are mainly low- and non-alcoholic beverages that have limited amount of previously studied knowledge about the efficiency of hygienic practices of their production. In addition, the microbiological quality of the products' raw materials was studied, and an attempt was made to identify the microbes occurring in the products and on the production line.</p> <p>The literature review deals with the legislation of food industry and the microbiological risks related to various types of beverages and their processing. In the experimental part of the thesis the microbiological hygiene of the bottling process was studied by collecting samples from the surfaces of the bottling line using mainly the microbiological swabbing method. The microbiological analyses of the bottled products were conducted by filtering the sample to a filter paper. Various culture mediums and antibiotics were also tested to identify the bacteria from yeasts and molds. 16S rRNA gene sequencing was used to identify the bacteria frequently occurring in the analyses. DNA isolation and PCR were conducted at the University of Helsinki and the gene sequencing was carried out by the Institute of Biotechnology. Sequence alignment was made using BLAST.</p> <p>The public version of the thesis lacks the confidential information which is provided only for Altia Oyj. Based on the results, the process hygiene of the R1 bottling line is sufficient in case the hygienic practices are followed. No significant microbiological growth was observed in the process hygiene samples. However, endospore producing bacteria were found in the products and these bacteria were presumed to originate from the raw materials of the products or from storage tanks and pipelines of these raw materials. Four bacterial genera, which frequently occurred in the products, were successfully identified. Nevertheless, based on the literature, it was noticed that these bacteria are not able to spoil alcoholic beverages nor to grow in the conditions of bottled products. However, some of these bacteria can substantially form biofilm.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Process hygiene, beverage industry, biofilm, 16S rDNA			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

Tiivistelmä

Abstract

Sisällysluettelo

1	JOHDANTO	1
2	KIRJALLISUUSOSIO	2
2.1	Elintarviketeollisuuden lainsäädäntö	2
2.2	Matala-alkoholiset juomat	6
2.2.1	Matala-alkoholisten juomien pilaajamikrobit	7
2.3	Matala-alkoholisten juomien raaka-aineet	9
2.3.1	Vesi	9
2.3.2	Sokerit	10
2.3.3	Etanoli	12
2.4	Mehut ja virvoitusjuomat	12
2.4.1	Mehujen ja virvoitusjuomien pilaantuminen	14
2.4.2	Mehujen ja virvoitusjuomien patogeeneit	15
2.4.3	Pastöroidut juomat	15
2.5	Biofilmit elintarviketeollisuudessa	16
2.6	Luminometria prosessihygienian valvonnassa	18
3	KOKEELLINEN TUTKIMUS	19
3.1	Tutkimuksen tavoite	19
3.2	Materiaalit ja menetelmät	20
3.2.1	Tutkimuksessa käytetyt mikrobien elatusalustat	20
3.2.2	Tuotteiden mikrobiologiset analyysit	21
3.2.3	Hygienia-äytteiden mikrobiologiset analyysit	21
3.2.4	Mikrobien identifiointimenetelmät	23
3.3	Tulokset	28
3.3.1	Tuotteet	28
3.3.2	Hygienia-äytteet	35
3.3.3	Kasvatusalustoiden testaus	37
3.3.4	Mikrobien identifiointi	38
4	POHDINTA	43
5	PÄÄTELMÄT	47

LIITTEET

Liite 1. Tutkimuksessa käytetyt elatusalustat, antibiootit ja antibioottien pitoisuudet sekä liuottimet

Liite 2. Hygienianäytteiden kohteet ja menetelmät

Liite 3. Geenisekvenssit FASTA-muodossa

Liite 4. Geenisekvenssien linjausten 10 parasta vastaavuutta

Liite 5. Tuotteet (Altia Oyj:lle toimitettu liite)

Liite 6. Mikrobiologisten analyysien tulokset (Altia Oyj:lle toimitettu liite)

1 JOHDANTO

Tutkimuksen toimeksiantajan Altia Oyj:n Rajamäen tehtaalla avattiin syksyllä 2017 uusi R1-pullotuslinja, jossa ajetaan pääsääntöisesti tehtaan valmistamia matala-alkoholisia tuotteita. Rajamäen tehtaalla matala-alkoholisia tuotteita on tehty vuodesta 2014 lähtien, joten joitakin matala-alkoholisten tuotteiden hygieniakäytäntöjä ja toimintatapoja oli jo olemassa tutkimuksen alkaessa, mutta niiden tehokkuudesta ei ollut tutkittua tietoa. Tämän työn tarkoituksena oli keskittyä R1-pullotuslinjan hygienian tutkimiseen ja kehittämiseen erityisesti prosessihygienian kannalta, mutta työssä tutkittiin myös tuotteiden raaka-aineiden mikrobiologista laatua.

Työn kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan pääsääntöisesti juomateollisuutta koskevaa lainsäädäntöä ja matala-alkoholisten sekä alkoholittomien juomien ja näiden raaka-aineiden sisältämiä mikrobiologisia riskejä elintarviketurvallisuuden näkökulmasta. Kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan lisäksi elintarviketeollisuudessa esiintyviä biofilmejä ja näiden ennaltaehkäisyä sekä luminometrian käyttöä prosessihygienian valvonnassa. Kirjallisuudesta pyrittiin hyödyntämään olemassa olevaa tietoa matala-alkoholisten tuotteiden mikrobiologisesta laadusta ja näiden tuotannon hygieniakäytännöistä lähinnä panimoteollisuuteen liittyvistä tutkimuksista, koska tähän tutkimukseen liittyvät alkoholituotteet olivat pääsääntöisesti mehu- ja vesityyppisiä ilman käymistä valmistettuja juomia, joista on melko vähän tieteellisiä tutkimuksia.

Työn kokeellisessa osiossa tutkittiin pääasiassa R1-pullotuslinjan mikrobiologista prosessihygieniaa, jolloin voitaisiin kehittää prosessin hygieniamenetelmiä ja toimintatapoja vastaamaan tehtaan matala-alkoholisten tuotteiden hygieenistä tuotantoa. Kokeiden avulla pyrittiin selvittämään kontaminaatioiden lähteitä ja tunnistamaan tuotteissa esiintyviä mikrobeja, sekä vertaamaan tuloksia kirjallisuudesta löytyvään tietoon, jolloin hygieniakäytäntöjä voitaisiin esimerkiksi tehostaa oikeissa kohteissa. Lisäksi pyrittiin kehittämään prosessihygienian seurantamenetelmiä esimerkiksi kokeilemalla erilaisia kasvatusalustoja hygienianäytteiden ja matala-alkoholisten tuotteiden mikrobiologisissa analyyseissä. Saatujen tulosten perusteella pyrittiin päättämään esimerkiksi nykyisten pesu- ja desinfiointiaineiden tehokkuus sekä miten tuotteissa havaitut mikrobit kasvavat tuotantoprosessin ja pullotettujen tuotteiden olosuhteissa.

2 KIRJALLISUUSOSIO

2.1 Elintarviketeollisuuden lainsäädäntö

Juomateollisuuden lainsäädäntö kuuluu muun elintarviketeollisuuden tapaan elintarvikelain (23/2006) piiriin. Suurin osa Suomen elintarvikelainsäädännöstä on Euroopan yhteisön lainsäädäntöä, mutta Suomessa sovelletaan myös kansallista elintarvikelakia ja muita asetuksia, joillain täsmennetään EU-lainsäädännön vaatimuksia. Elintarvikelainsäädännöllä pyritään varmistamaan elintarvikkeiden ja niiden käsittelyn turvallisuus sekä elintarvikkeiden terveydellinen laatu. Laissa määritellään, että toimijan on tunnettava elintarviketurvallisuuteen liittyvät riskit, jotka käyvät ilmi toimijan itse laadittavasta omavalvontasuunnitelmasta. (Maa- ja metsätalousministeriö 2006; Evira 2018a)

Euroopassa ja Suomessa elintarvikealan omavalvonta perustuu HACCP-periaatteisiin (Hazard Analysis and Critical Control Points), jonka avulla toimija pyrkii varmistamaan, että tuotettava elintarvike ja elintarvikehuoneisto täyttävät elintarvikemääräyksissä asetetut vaatimukset. Omavalvonnan avulla toimijan tulee hallita toimintansa riskit. Elintarvikealan toimijan on varmistettava, että elintarvikkeet ovat esimerkiksi mikrobiologiselta laadultaan sellaisia, että ne eivät aiheuta vaaraa ihmisen terveydelle. HACCP-periaatteiden soveltaminen perustuu Eviran ohjeeseen 10002/1. Omavalvonnan toteutusta valvoo viranomainen, joka myös neuvoa lainsäädännön soveltamista koskevissa kysymyksissä, mutta ei anna yksityiskohtaisia neuvoja siitä, kuinka toiminta vastaisi lainsäädännön vaatimuksia. (Evira 2018b; EFSA 2018)

Euroopan parlamentti ja neuvosto on määrännyt yleisen elintarvikehygieniasetuksen (EY/852/2004), jossa korostetaan elintarvikehygienian tarkoittavan toimenpiteitä, joilla voidaan hallita elintarvikkeisiin liittyviä vaaroja. Elintarvikehygienian tavoitteena on suojata kuluttajaa ihmisravinnoksi soveltumattomien elintarvikkeiden aiheuttamilta terveydellisiltä riskeiltä sekä sillä pyritään estämään elintarvikkeiden ennenaikaista pilaantumista. Suurin osa Suomessa tapahtuvista ruokamyrkytyksistä johtuu hygieenisten työskentelytapojen laiminlyönnistä. (Evira 2018c; Maa- ja metsätalousministeriö 2011)

Euroopan Unionissa juomateollisuuden tuotteet ovat EU-lainsäädännön alaisia esimerkiksi mikrobiologisilta kriteereiltään ja yleisiltä tuotantohygieniavaatimuksiltaan. GHP (Good Hygiene Practices) ja GMP (Good Manufacturing Practices) -periaatteet kuuluvat osana

toimijan ennaltaehkäiseviin toimiin elintarviketurvallisuuden takaamiseksi. Mikrobikriteeriasetuksen (Komission asetus (EY) N:o 2073/2005) mukaan elintarvikealan toimijan on varmistettava, että elintarvikkeet täyttävät asetuksen vaatimukset. Asetus perustuu EU:n strategiaan mikrobiologisten kriteerien asettamiseksi, Euroopan elintarviketurvallisuusviraston (EFSA) mielipiteisiin ja kansainvälisiin periaatteisiin, joita sovelletaan Codex Alimentariuksessa (CAC/RCP 1-1969). Asetuksen mikrobiologiset vaatimukset on pääsääntöisesti suunnattu käytettäväksi omavalvonnassa, mutta viranomaiset todentavat, että toimijoille asetetut vaatimukset täyttyvät. Mikrobiologisia kriteereitä koskevia vaatimuksia sovelletaan markkinoille saatettuihin tuotteisiin, mutta prosessin hygieniää koskevia vaatimuksia sovelletaan ainoastaan valmistusprosessin aikana. (Evira 2018d)

Mikrobiologisia vaatimuksia asetetaan esimerkiksi silloin kun pidetään tarpeellisena tutkia mikro-organismeja ja niiden tuottamia myrkyllisiä yhdisteitä tai vaatimusten katsotaan osaltaan parantavan elintarviketurvallisuutta. Elintarviketurvallisuus varmistetaan kuitenkin tehokkaammin hyvillä hygieniakäytännöillä kuin tuotteita tutkimalla, jos haitallisia mikro-organismeja esiintyy elintarvikkeessa vain harvoin.

Eviran ohje 10501/2 (Elintarvikkeiden mikrobiologiset analyysit, komission asetuksen (EY) No 2073/2005 soveltaminen) sanoo mikrobiologisten vaatimusten osatekijöistä seuraavaa:

Mikrobikriteeriasetuksen jokainen raja-arvo liittyy määriteltyyn mikro-organismiin, elintarvikeluokkaan, analyysimenetelmään ja elintarvikeketjun kohtaan. Elintarvikkeen mikrobiologinen vaatimus koostuu seuraavista osa-alueista:

- tutkittava mikro-organismi, sen tuottama toksini tai metaboliitti
- elintarvikeluokka
- elintarvikeketjun kohta, jossa vaatimusta sovelletaan
- analyysimenetelmä
- näytteenottosuunnitelma
- raja-arvot ja tutkimustulosten tulkinta
- kuvaus toimenpiteistä, joihin ryhdytään raja-arvojen ylittyessä

Elintarvikkeiden mikrobiologiseen laatuun liittyvät tutkimukset ovat ensisijaisesti toimijan vastuulla. Tutkimukset ovat pääasiassa tuotteen laatua kuvaavat indikaattoribakteeritutkimukset (esimerkiksi aerobisten mikrobien pesäkeluku, maitohappobakteerit, enterobakteerit sekä hiivat ja homeet). Mikrobikriteeriasetuksessa on laatuun liittyviä raja-arvoja

esimerkiksi aerobisten mikro-organismien pesäkeluvulle jauhelihan valmistuksessa. Eviran ohjeessa 10501/2 sanotaan seuraavaa:

Muille laatuun liittyville tutkimuksille kuin mikrobikriteeriasetuksessa mainituille prosessi-hygieniavaatimuksille ei ole olemassa lainsäädännössä raja-arvoja. Toimijan tulee itse määritellä raja-arvot, joita tuotteen laadun arviointiin käytetään. Tulosten arvioinnissa voidaan käyttää hyväksi mm. toimijoiden omavalvonnassaan tekemiä kartoitustutkimuksia (trendit) ja elintarvikelaboratorioiden kokemukseen perustuvia tutkimustuloksia. Tutkimustulosten tulkinnassa voidaan soveltuvin osin käyttää apuna Elintarviketeollisuusliiton (ETL) Elintarvikkeiden mikrobiologisia ohjausarvoja viimeisenä käyttöpäivänä (<http://www.etl.fi>).

Mikrobikriteeriasetuksen liitteessä I mainitut mikro-organismit jaetaan lisäksi kolmeen ryhmään: 1) sairauksia aiheuttavat eli patogeeniset mikro-organismit, 2) indikaattoribakteerit, joita käytetään patogeenisten bakteerien esiintymisen ja ulostesaastutuksen indikaattoreina ja 3) indikaattoribakteerit, joita käytetään hygienian arviointiin esimerkiksi määrittämällä aerobiset mikro-organismit. Mikrobiasetuksessa sanotaan lisäksi:

Asetuksen liitteenä olevista turvallisuusvaatimuksista ei saa poiketa. Sen sijaan prosessihygieniavaatimukseen kuuluvia mikro-organismeja voidaan korvata muilla mikro-organismeilla ja jopa raja-arvoja muilla raja-arvoilla, jos toimija pystyy osoittamaan, että näin taataan vähintään yhtä hyvä elintarviketurvallisuustaso kuin asetuksen vastaavalla vaatimuksella. Lisäksi yritys voi omavalvonnassaan tutkia muitakin mikrobeja kuin niitä, joista säädetään mikrobikriteeriasetuksessa.

Elintarvikealan toimija voi analyysimenetelmää valitessaan ottaa yhteyttä hyväksyttyyn elintarvikelaboratorioon tai Eviraan (ohjeen kohta 7). (Evira 2017)

Prosessihygienian analyysimenetelmistä ei säädetä mikrobikriteeriasetuksessa. Analyysimenetelmiä ovat esimerkiksi erilaiset kontaktilevyt ja kasvatusalustat sivelynäytteille, joilla voidaan määrittää haluttuja mikrobeja, esimerkiksi aerobisten mikrobien kokonaisluku tai enterobakteerit. Luminesenssiin perustuvat ATP-testit ja pinnoilla olevien proteiinien osoittamistestit ovat nopeita menetelmiä prosessihygienian seuraamiseen. Pintapuhtaustutkimuksia voidaan tehdä muuallakin kuin hyväksytyssä laboratoriossa, jos käytettävien mittareiden ja kontaktilevyjen käyttöohjeita noudatetaan. Mikrobiologisiin tutkimuksiin liittyy aina

mittausepävarmuus, mutta mikrobikriteeriasetuksessa ei säädetä, miten se tulisi ottaa huomioon omavalvonnassa. (Evira 2018e)

Mikrobikriteeriasetus määrittää prosessin hygieniää koskevia vaatimuksia. Niitä sovelletaan tuotantoprosessin aikana ja niillä pyritään varmistamaan, että tuotteen valmistusprosessi toimii hyväksyttävästi. Eviran ohjeessa 10501/2 sanotaan prosessihygieniavaatimuksesta seuraavaa:

Prosessihygieniavaatimuksen raja-arvon ylityksestä on mikrobikriteeriasetuksen liitteessä I kunkin prosessihygieniavaatimuksen osalta mainittu toimenpiteet, joihin raja-arvon ylittyessä on ryhdyttävä. Lisäksi on otettava huomioon omavalvontajärjestelmän edellyttämät korjaavat toimenpiteet. Epäilyssä saastumisesta (kontaminaatioissa) tulee näytteenottoa tarvittaessa tihentää ja kasvattaa osanäytteiden tai näytteiden määrää mahdollisen saastumisenlähteen ja laajuuden selvittämiseksi. Tarvittaessa on tehtävä muutoksia omavalvontasuunnitelmaan.

Mikrobikriteeriasetuksen mukaan elintarvikealan toimijan tulee itse määrittää rajat pintapuhtausnäytteiden tuloksille. Mahdollisia korjaavia toimenpiteitä tulosten ylittyessä on esimerkiksi siivouksen tehostaminen ja ohjeistuksen parantaminen. Tulosten trendiseurannan perusteella toimija voi asettaa omia prosessikohtaisia raja-arvoja. Elintarvikkeen kanssa kosketuksiin joutuvien pintojen tuloksia tulee arvioida kriittisemmin kuin tuloksia esimerkiksi pakkausten kuljetinhihnalta. (Evira 2018f)

Trendiseurannalla voidaan tarkastella tutkimustulosten kehityssuuntauksia. Toimijan on ryhdyttävä toimenpiteisiin, jos suuntaus esimerkiksi tuotteessa tai pintapuhtausnäytteissä on heikkenevä. Kehityssuuntauksia tarkastelemalla voidaan arvioida prosessihygienian toimintaa ja näin estää mikrobiologisia riskejä. (Evira 2018f)

Elintarvikealan toimijoiden on tuotteesta riippuen tehtävä elintarvikkeen säilyvyystutkimuksia turvallisen säilyvyysajan määrittelemiseksi, millä voidaan varmistaa, että elintarvike täyttää esimerkiksi niille asetetut ja ilmoitetut mikrobiologiset vaatimukset myyntiajan loppuun saakka. Vaatimus koskee myös tuotteita, joille asetetaan parasta ennen -päiväys. Säilyvyystutkimuksia tulee tehdä esimerkiksi, kun kyseisen tuotteen säilyvyydestä ei ole riittävää näyttöä (esimerkiksi uudet tuotteet) tai kun tuote tai sen valmistus- tai pakkaustapa oleellisesti muuttuu. Kaikille elintarvikkeille ei kuitenkaan tarvitse tehdä säilyvyystutkimuksia,

vaan tällöin voidaan käyttää yleisesti käytössä olevia säilyvyysaikoja. Tällaisia tuotteita on esimerkiksi pullotettu vesi, virvoitusjuomat ja pastöroidut mehut. Säilyvyystutkimuksen laajuus riippuu tutkittavasta tuotteesta. Elintarvikealan toimijan tulee selvittää tuotteensa mahdolliset patogeenisten bakteerien kasvu- ja selviytymismahdollisuudet tieteellisen kirjallisuuden ja tutkimustulosten perusteella. Eviran ohjeessa 10501/2 sanotaan lisäksi seuraavaa:

Tutkimusten tuloksia voidaan käyttää matemaattisiin ennustemalleihin tai perusteluina sille, että tuotteiden ominaisuudet eivät ole suotuisat mikrobien kasvulle. Kirjallisuudesta löytyy yleensä tietoa tuoreiden tuotteiden pH- ja aw-arvoista, joten omia laboratorioanalyyskejä ei välttämättä tarvitse tehdä. Jos tietoa ei löydy, toimijan tulisi itse tehdä tarvittavat analyysit.

Terveysturvallisuuslain perusteella on annettu talousvettä koskevat asetukset (461/2000 ja 401/2001), jotka perustuvat EU-direktiiviin 1998/83/EY. Talousvedellä tarkoitetaan juomavetenä ja elintarvikkeiden käsittelyyn käytettävää vettä. Elintarviketeollisuudessa käytettävän veden laadusta annetaan määräyksiä elintarvikehygieniää koskevassa säädöksessä (EY/852/2004). (Korkeala 2007)

Vesilaitokset seuraavat talousveden laatua säännöllisesti Terveysturvallisuuslain (763/1994) perusteella. Talousveden hygieenistä laatua seurataan indikaattoriorganismien avulla. *Escherichia coli* -bakteeria käytetään osoittamaan mahdollinen ihmisten tai eläinten ulosteperäinen kontaminaatio talousvedessä. Koliformiset bakteerit osoittavat pintavesien pääsyä veteen ja vedenkäsittelyn mikrobiologista tehokkuutta. Juomiseen tarkoitettussa vedessä ei saa olla osoitettavissa *E. coli*a eikä koliformisia bakteereita 100 ml:ssa vettä. Veden yleisen laadun ja veden käsittelyn tehokkuuden arvioimiseen käytetään mikrobien kokonaispesäkeluvun määrittämistä. (Korkeala 2007)

2.2 Matala-alkoholiset juomat

Matala-alkoholiset juomat ovat usein happamia, hiilihapotettuja ja niillä on matala happipitoisuus. Nämä tekijät yhdessä alkoholin kanssa vaikeuttavat mikro-organismien kasvua alkoholituotteissa. Vain harva mikrobi voi pilata alkoholituotteen, ja näitä on esimerkiksi fermentoivat hiivat ja happoa kestävät maitohappobakteerit. Matala-alkoholisista juomista ainoastaan oluen mikrobiologista pilaantumista on tutkittu laajasti. Esimerkiksi skandinaavisten siiderien mikrobiologisia riskejä on arvioitu perustuen ainoastaan tuotteiden ominaisuuksiin ja tuotantotapoihin, koska aiheesta ei ole tutkittua tietoa. (Juvonen ym. 2011)

Elintarvikkeen mikrobiologinen kontaminaatio juomateollisuudessa tapahtuu yleensä tuotantovaiheessa. Raaka-aineet, tuotantoympäristö, laitteiden ja pakkausten mikrobiologinen laatu ja hygieniakäytäntöjen vaillinaisuus ovat mahdollisia kontaminaation lähteitä. Elintarvikkeen mikrobiologinen pilaantuminen on metabolinen prosessi, joka aiheuttaa juomiin ei-haluttuja ominaisuuksia, kuten hajuja ja nesteen kuohumista (Kregiel 2015). Patogeenisten bakteerien selviämistä ja kasvua alkoholijuomissa on tutkittu tarkemmin ainoastaan oluissa. (Juvonen ym. 2011)

Juomateollisuuden hiilidioksidipitoisten tuotteiden pääasiallisina pilaajina pidetään hiivoja, jotka voivat kasvaa pH-alueella 1,5-8,5. Tiedetyt hiivat toimivat indikaattoriorganismeina huonoista hygieniakäytännöistä, mutta eivät kuitenkaan pilaa tuotetta. Tällaisia hiivoja on esimerkiksi *Rhodotorula*-, *Sporidiobolus*- ja *Aureobasidium*-hiivat. Varsinkin virvoitusjuomateollisuudessa näitä hiivoja löydetään tuotantolaitteiden pinnoilta ja paikoista, jotka ovat vaikeasti desinfioitavissa. Myös eräitä homeita tavataan virvoitusjuomateollisuudessa, kuten *Aspergillus*-, *Penicillium*- ja *Rhizopus*-homeita. Homeitiöt eivät voi kasvaa hiilihapotetuissa juomissa, mutta ne voivat kuitenkin säilyä elinkelpoisina. (Kregiel 2015)

Panimoympäristössä oluiden pullotuslaitteiden on huomattu olevan mikrobiologisten kontaminaatioiden lähteenä, koska esimerkiksi täyttöpillien läheisyydessä happipitoisuus ja lämpötila on suurempi. Tällaiset olosuhteet suosivat esimerkiksi etikkahappobakteerien, koliformisten bakteerien ja aerobisten villihiivojen kasvua. Juomien täyttöpilleistä on eristetty lisäksi esimerkiksi *Gluconobacter*- ja *Lactobacillus*-bakteereja sekä *Pichia*-, *Rhodotorula*-, ja *Saccharomyces*-hiivoja (Storgårds 2000). Henrikssonin ja Haikaran (1992) tutkimuksessa täyttölaitteiden ja korkituskoneiden prosessin aikaisen desinfioinnin huomattiin myös olevan tärkeää; desinfiointi ainoastaan prosessin alussa ja lopussa ei vähentänyt riittävästi ilmassa olevia oluen pilaajamikrobeja. Backin (1994) tutkimuksessa laitteiston pesuun käytettävän kuuman veden lämpötilan tuli olla 80-95 °C:tta, jotta voitiin vähentää pullotuksessa tapahtuvia sekundäärisiä kontaminaatioita. Lisäksi kuumaa vettä tuli käyttää kahden tunnin välein kesäaikaan ja neljän tunnin välein talviaikaan. (Storgårds 2000)

2.2.1 Matala-alkoholisten juomien pilaajamikrobit

Fermentatiiviset hiivat ovat tyypillisiä matala-alkoholisten juomien pilaajia, koska ne voivat fermentoida sokereita happamissa ja vähähappisissa olosuhteissa. Hiivojen kasvun estämiseksi säilöntäaineina käytetään tyypillisesti sorbaattia tai bentsoaattia. Osa matala-

alkoholisten juomien pilaajakannoista ovat säilöntäaineresistenttejä. Perinteisissä siidereissä *Saccharomyces ludwigii* on vaarallisin pilaajaorganismi, koska se voi elää suurissa sulfiittipitoisuuksissa (1000-1500 mg/l). Kontaminaatio tapahtuu yleensä pullotuksen yhteydessä. *Sc. ludwigii* muodostaa pullotettuun tuotteeseen samentumia ja suuria määriä asetaldehydeja ja asetoinia, jotka tekevät tuotteesta pistävän hajuisen ja voimakuisen. Sokerien fermentaatio sulfiitille toleranttien *Saccharomyces*- ja *Zygosaccharomyces*-kantojen (*Z. bailii* ja *Z. lentus*) toimesta voi johtaa pullojen hajoamiseen paineen nousun seurauksena. (Juvonen ym. 2011) Useat pilaajamikrobit, kuten *Z. bailii*, *D. bruxellensis*, *Sz. pombe* ja *S. cerevisiae*, voivat myös tuottaa haihtuvia fenoleja raaka-aineena käytettävien mehujen fenolihaapoista. Haihtuvat fenolit tuottavat makuhaittoja suurissa pitoisuuksissa. (Harris ym. 2008) Maitohappobakteereista tärkeimpinä matala-alkoholisten juomien pilaajina pidetään *Lactobacillus*- ja *Pediococcus*-suvun bakteereja. Asidofiilinen alkoholille resistentti *Lactobacillus* voi muodostaa makuhaittoja ja se tunnetaan esimerkiksi skandinaavistyylisten siiderien pilaajana. Heterofermentatiiviset lajit voivat tuottaa suuria määriä etikkahappoa, joka vaikuttaa tuotteen aromiin. Jotkin *Lactobacillus*-lajit muodostavat diasetyyliä hedelmämeijerijäätelöjen sitruunahaposta, mikä esimerkiksi siidereissä voi tuottaa voimakasta makua tuotteeseen. (Juvonen ym. 2011)

Pediococcus-suvun maitohappobakteerit ovat fakultatiivisesti aerobisia bakteereja, jotka kasvavat hyvin hiilidioksidin läsnä ollessa. *Pediococcus* vaatii kuitenkin hyvin kompleksisen kasvuympäristön, johon kuuluu esimerkiksi useita aminohappoja ja vitamiineja. Bakteeri tuottaa maitohappoa glukoosista ja useat kannat vaativat lisäksi mangaania ja kalsiumia kasvuunsa. *Pediococcus* aiheuttaa alkoholijuomissa samentumia sekä voimakasta makua muodostamalla diasetyyliä ja maitohappoa. Bakteeri voi myös tuottaa haihtuvia fenoleja (Juvonen ym. 2011). Zhangin ym. (2005) ja Zhangin & Dongin (2006) tutkimuksessa eristettiin kaksi uutta etanolia kestävästä *Pediococcus*-suvun bakteeria, *P. cellicola* ja *P. ethanolidurans*, tislauksenympäristöstä. Ne voivat olla potentiaalisia alkoholijuomien pilaajia, koska ne kestävät yli 6,5 % etanolipitoisuutta pH:ssa 3,5.

Acetobacter- ja *Gluconobacter*-suvun etikkahappobakteerit ovat tyypillisiä matala-alkoholisten juomien laadun pilaajabakteereita. Ne kasvavat kuitenkin vain hapellisissa olosuhteissa, mutta voivat säilyä pitkiä aikoja vähähappisessa ympäristössä (Bartowsky ja Henschke 2008). Siiderin valmistuksessa ja panimoympäristöissä tyypillisiä lajeja ovat *A. pasteurianus* ja *G. oxydans*. Useimmat etikkahappobakteerit hapettavat etanolia etikkahapoksi. *Acetobacter* ja *Gluconacetobacter* pystyvät hajottamaan etikkahapon hiilidioksidiksi

ja vedeksi. *Acetobacter* kestää etanolia paremmin kuin *Gluconobacter*-suvun bakteerit, jotka suosivat sokeripitoista ympäristöä. Etikkahappobakteerit aiheuttavat ongelmia ainoastaan silloin, kun tuotteen pakkaus päästää happea sisäänsä (Bartwosky ja Henschke 2008). Pilaantunut tuote on tyypillisesti etikkaisen makuinen ja sen pH ja etanolipitoisuus on madaltunut (Raspor ja Goranovic 2008).

Zymomonas mobilis on yksi tärkeimmistä siiderien pilaajamikrobeista. *Z. mobilis* on gram-negatiivinen anearobi, joka fermentoi fruktoosia ja glukoosia etanoliksi ja hiilidioksidiksi. Bakteeri muodostaa myös pieniä määriä asetaldehydeja ja rikkivetyä tuotteeseen. Etenkin siiderit, joiden pH on yli 3,7, ovat alttiita pilaantumiselle. Itiöitä muodostavat bakteerit eivät yleensä aiheuta ongelmia alkoholijuomissa niiden sisältämän hiilidioksidin ja happamuuden takia. (Juvonen ym. 2011)

2.3 Matala-alkoholisten juomien raaka-aineet

Tuotettaessa mikrobiologisesti turvallisia juomia, raaka-aineiden laadun kontrollointi on tärkeä osa prosessia. Maaperä on yleensä lähteenä itiöitä muodostaville bakteereille ja kuumentusta kestäville homesienille, kuten esimerkiksi *Byssochlamus*-suvun homeille, joita käytetään myös indikaattoriorganismeina pakkausten steriloinnin tehokkuuden määrittämiseen. Korkealaatuiset raaka-aineet ja niiden käsittely ja varastointi sekä hyvä tuotantohygienia on edellytys tuotettaessa mikrobiologisesti turvallisia juomia. Huonolaatuiset raaka-aineet saattavat sisältää haitallisia aineenvaihduntatuotteita ja bakteerien itiöitä, joita ei voida poistaa tuotannon aikana, vaikka tuote olisi esimerkiksi pastöroitu. Tuotteiden kuljetusolosuhteisiin ja sen jälkeiseen varastointiin on syytä kiinnittää huomiota, varsinkin jos kyseessä on esimerkiksi mehu, jonka pH on yli 4,6. GMP-periaatteen noudattaminen ja tuotantolaitteiden pesu ja desinfektio auttavat minimoimaan tuotteiden kontaminoitumista. Säännöllinen puhdistaminen ehkäisee esimerkiksi biofilmien muodostumista, jotka muuten voisivat kasvattaa bakteerien vastustuskykyä desinfektioaineille. (Ahvenainen 1988; Juvonen ym. 2011)

2.3.1 Vesi

Vesi on juomateollisuuden tuotteiden pääasiallinen komponentti. Juoma- ja prosessiveden laatua kontrolloidaan erilaisilla kemiallisilla, fysikaalisilla ja mikrobiologisilla menetelmillä. Huonolaatuinen vesi voi tuoda taudinaiheuttajia ja muita pilaajamikrobeja tuotantoympäristöön ja lopputuotteisiin (Juvonen ym. 2011). Suomessa pohjavesi on yleensä

hyvälaatuista, joten sitä ei usein käsitellä muuten kuin kalkilla pH:n nostamiseksi. Tämän jälkeen vesi yleensä vielä suodatetaan hiekkakerroksen läpi. Näin prosessoitua talousvettä ei yleensä desinfioida, mutta Suomessa useat pohjavesilaitokset ovat hankkineet UV-laitteiston veden desinfioimiseksi, jotta mikrobiologinen laatu voidaan turvata (Korkeala 2007). Vesi sisältää aina vähintään pieniä määriä mikrobeja riippuen mistä vesi on otettu. Vedessä on monia erilaisia harmittomia heterotrofisia mikro-organismeja, kuten *Flavobacterium*-, *Pseudomonas*- ja *Acinetobacter*-lajeja (ICMSF 1998). Elintarvikkeiden prosessointiin käytettävä vesi sisältää samoja organismeja kuin talousvesi ja sen kontrollointiin ja käsittelyyn on käytettävä samoja menetelmiä kuin talousveden käsittelyyn (ICMSF 1998).

Vedessä bakteerisolut voivat olla viable non-culturable -tilassa, jolloin ne ovat eläviä, mutta niitä ei voi viljellä. Olosuhteiden muuttuessa suotuisiksi mikrobit virkoavat ja voivat muuttua haitallisiksi. Vesivälitteisesti leviäviä tauteja aiheuttavia mikrobisukuja- ja lajeja on nykyään noin 30-40, johon kuuluu bakteereita, alkueläimiä ja viruksia. Taudinaiheuttajat jaetaan yleisesti kahteen ryhmään, ulosteperäisiin ja opportunistisiin, ympäristöperäisiin patogeeneihin. Ympäristöperäiset patogeenit pystyvät lisääntymään esimerkiksi muodostamalla järjestelmiin biofilmejä, jos järjestelmiä ei kontrolloida asianmukaisella tavalla, esimerkiksi huolehtimalla riittävästä puhtaudesta ja desinfioinnista (Korkeala 2007). Lisäksi pohjaveen voi päästä mikrobiologisia kontaminantteja esimerkiksi imeytymällä maakerroksen läpi, putkistovuotojen seurauksena tai sadevesien mukana. Vesivälitteisten epidemioiden seurauksena on löydetty muun muassa *Campylobacter jejuni*, *Escheria coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* sekä *Salmonella*- ja *Shigella*-sukuihin kuuluvia patogeenisiä bakteereita (ICMSF 1998).

2.3.2 Sokerit

Virvoitusjuomissa makeutusaineina käytetään usein nestesokereita, jotka valmistetaan liuottamalla kidesokeria veteen. Kidesokeri valmistetaan tyypillisesti ruokosokerista, jonka alkuperäinen mikrobisto on pääasiassa peräisin maaperästä. Ruokosokerin lehdistä on tyypillisesti eristetty esimerkiksi *Bacillus*-, *Lactobacillus*-, *Pseudomonas*- ja *Enterobacter*-sukuihin kuuluvia bakteereita (ICMSF 1998). Raakasokeri käsitellään kuumentamalla, joten sen alkuperäinen mikrobisto on suurimmaksi osaksi tuhoutunut. Mikrobipopulaatio koostuukin tällöin lähinnä lämmönkestävistä *Bacillus*- ja *Clostridium*-itiöistä, *Aspergillus*- ja *Penicillium*-homeista sekä *Zygosaccharomyces rouxii*-, *Candida*- ja *Pichia*-hiivoista. Makeutusaineet ja sokeri ovat yleisiä pilaajaorganismien lähteitä elintarviketeollisuudessa, ja niiden

käsittelyssä onkin huolehdittava hyvän tuotantohygienian ylläpidosta osmofiilisten hiivojen kasvun estämiseksi. Sokerit tulee esimerkiksi säilyttää kuivassa, jotta voidaan estää mikrobiologinen kasvu (Korkeala 2007). Jalostettu sokeri sisältää kuitenkin myös bakteereita, kuten *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *C. thermosaccharolyticum* sekä mesofiilisiä bakteereita, jotka voivat pilata tuotteen, kun niitä käytetään esimerkiksi pullotettujen juomien raaka-aineina (Thompson 2009). Sokerien käyttäminen myös lisää bakteerien ja hiivojen lämmönkestävyyttä, joka on hyvä ottaa huomioon paljon sokeria sisältävissä tuotteissa (Wareing ja Davenport 2007). Murdock ym. (1952) tutkivat maitohappobakteerien ja hiivojen lämmönkestävyyttä pastöroiduissa mehuissa. Organismit säilyivät paremmin elinkelpoisina suuremmassa sokeripitoisuudessa, mikä saattoi johtua esimerkiksi organismeille soveltuvasta osmoottisesta paineesta.

Nestesokerit ovat pitoisuudeltaan keskimäärin 67 °Bx ja niiden veden aktiivisuus on matala. Osmofiiliset hiivat, kuten *Z. rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae* ja *Saccharomyces mellis* sekä homeet, voivat kasvaa nestesokereissa. Jos nestesokeri sisältää kyseisiä hiivoja ja sitä käytetään muiden tuotteiden raaka-aineina, ne voivat tällöin toimia tuotteen pilaajina (ICMSF 1998, Thompson 2009). Matalan veden aktiivisuuden vuoksi bakteerit eivät kasva nestesokereissa, ja matala veden aktiivisuus myös kontrolloi hiivan kasvua sokeriliuoksissa, jonka vuoksi on hyvin tärkeää välttää veden kondensoitumista sokeriliuosten säilytystankeissa. Kondenssivesi voi lisätä veden aktiivisuutta, mikä voi aiheuttaa mikrobien nopeaa kasvua. Lisäksi huonosti pestyihin sokeriliuoksia sisältäviin putkistoihin ja venttiileihin voi muodostua laajaa mikrobiologista kasvustoa. Nestesokerien valmistajat käsittelevät sokeriliuokset esimerkiksi suodattamalla, kuumentamalla ja ultraviolettisäteilyllä mikrobiologisen pilaantumisen ehkäisemiseksi. Käsitelty nestesokeri voi kuitenkin altistua pilaantumiselle, mikäli elintarvikevalmistaja ei tuotannossaan käytä sitä välittömästi (ICMSF 1998, Juvonen ym. 2011). Nestesokerin kontaminaatiota varastoinnin aikana voidaan välttää hyvien hygieniakäytäntöjen lisäksi käyttämällä tankeissa ilmansuodattimia. Nestesokerissa veden kondensoitumista tapahtuu herkästi ilman säilytystankkien riittävää ilmastusta (Thompson 2009). Kontaminoitunut nestesokeri voi aiheuttaa virvoitusjuomien pilaantumista, mikäli kontaminaation aiheuttavat sellaiset mesofiiliset bakteerit, hiivat tai homeet, jotka voivat kasvaa virvoitusjuomien happamuusoloissa (Korkeala 2007).

2.3.3 Etanoli

Altia Oyj:llä matala-alkoholisina pidetään tuotteita, joissa etanolia on korkeintaan 10 % (v/v) (Jatila 2018). Tässä pitoisuudessa etanoli ei yksin riitä estämään tuotteen pilaantumista, jonka aiheuttavat fermentatiiviset hiivat tai happamuutta ja alkoholia kestävät bakteerit. Hiivojen fermentointiaktiivisuuden on huomattu olevan alhaisin alkoholipitoisuuden ollessa 4,8-6,0 % (v/v) BMB-tuotteissa (beer mixed beverages) (Juvonen ym. 2011). Panimoympäristössä patogeenisista bakteereista esimerkiksi *E. colin* ja *Salmonellan* on huomattu kasvavan 4 % (v/v) etanolipitoisuudessa sokeripitoisessa vierteessä, jonka pH oli 5,5. *Listeria monocytogenes* -bakteerin ei huomattu kasvavan 3 % (v/v) etanolipitoisuudessa, mutta se säilyi elävänä yli 5 päivää 5 % etanolipitoisuudessa (Menz ym. 2010). Siiderin pilaajabakteeri *Z. mobilis* kestää hyvin etanolia ja se voi kasvaa yli 9 % etanolipitoisuudessa. Maitohappobakteerit voivat kestää hyvinkin suuria etanolipitoisuuksia. Esimerkiksi *L. heterohiochii* ja *L. homohiohnii* voivat kasvaa yli 18 % etanolipitoisuuksissa, ja nämä bakteerit voivat aiheuttaa saken pilaantumista (Ingram 1990).

2.4 Mehut ja virvoitusjuomat

Hedelmämehuja käytetään nykyään paljon juomateollisuudessa. Virvoitusjuomissa ja alkoholijuomissa käytettävät hedelmämehut sisältävät luonnostaan pilaajamikrobeja, ja ne voivat sisältää myös patogeenejä, ellei niitä ole käsitelty asianmukaisella tavalla. Maaperää lähellä kasvavat hedelmät kontaminoituvat todennäköisesti varmemmin itiöitä muodostavista mikrobeista kuin hedelmät, jotka kasvavat kauempana maaperästä. Kuivatut raaka-aineet, kuten mausteet, voivat sisältää taudinaiheuttajia ja muita pilaajamikrobeja sekä esimerkiksi mykotoksiineja. Juomateollisuudessa käytettävät muut raaka-aineet, kuten hiilidioksidi, mineraalit, hapot, luonnolliset ja keinotekoiset aromit ja väriaineet eivät tavallisesti sisällä kontaminaatoriskia. Nykypäivänä uusien ja eksoottisten raaka-aineiden yleistynyt käyttö voi aiheuttaa odottamattomia ongelmia juomien mikrobiologisessa laadussa. Esimerkiksi eksoottisten hedelmien mikrobiologista ekologiaa on tutkittu hyvin vähän, joten ne voivat olla lähteenä uusille vahingollisille mikrobeille ja aineenvaihduntatuotteille. (Juvonen ym. 2011)

Mehuissa ja virvoitusjuomissa käytettävät hedelmät ja marjat sisältävät runsaasti orgaanisia happoja, kuten viini-, sitruuna- ja omenahappoa, ja niiden luontainen pH on 2,0-4,5. Veden aktiivisuudella on suuri merkitys mehujen ja virvoitusjuomien säilyvyyden kannalta.

Mehutiivisteistä vesi on haihdutettu pois ja niiden veden aktiivisuus on hyvin matala. Tiivisteiden sokeripitoisuus on noin 40-65 %. (ICMSF 1998)

Mehuissa ja virvoitusjuomissa on yleensä suuri hiilihydraattipitoisuus, joka koostuu mikrobeille helposti hyödynnettävistä glukoosista, fruktoosista ja pektiineistä. Juomien alhainen redox-potentiaali kuitenkin hillitsee mikrobikasvustoa. Esimerkiksi hapen poistuminen pastöroinnissa ja hiilidioksidin käyttäminen laskevat redox-potentiaalia. Lisäksi pakkauksen hapenläpäisykyky vaikuttaa merkittävästi redox-potentiaaliin. Monet marjat ja hedelmät sisältävät luonnostaan antimikrobisia aineita, kuten bentsoe- ja sorbiinihappoa. Yksittäisen aineen pitoisuus tuotteessa tai tuotteen muu ominaisuus ei kuitenkaan yleensä takaa säilyvyyttä, mutta ne täydentävät toisiaan ja tukevat muita säilöntämenetelmiä. (Korkeala 2007)

Marja- ja hedelmätuotteissa esiintyy samoja mikrobeja kuin niiden valmistukseen käytetyissä hedelmissä ja marjoissa. Mehut ja virvoitusjuomat eivät yleensä aiheuta terveysvaaraa, mutta jotkin raaka-aineet saattavat sisältää kuitenkin patogeenisia mikrobeja, jotka on esitelty kohdassa 2.4.2 (Mehujen ja virvoitusjuomien patogeenit). Tuoreet hedelmät ja tuorepuristetut hedelmämehut sisältävät pääasiassa hiivoja ja homeita, jotka kuuluvat esimerkiksi *Candida*-, *Rhodotorula*-, *Brettanomyces*- ja *Cryptococcus*-sukuihin. Fermentoidut omenamehut voivat sisältää kotoitiöitä muodostavia hiivoja, kuten *Saccharomyces*-, *Pichia*-, *Debaryomyces*- ja *Saccharomycopsis*-suvun hiivoja. Myös rypälemehut voivat kontaminoitua pääasiassa kotoitiöitä muodostavista hiivoista, kuten *Saccharomyces*-, *Zygosaccharomyces*-, *Hanseniaspora*- ja *Pichia*-hiivoista. Tuoreista hedelmistä ja mehuista on eristetty myös esimerkiksi *Penicillium*-, *Aspergillus*-, *Paecilomyces*- ja *Cladosporium*-homeita. Lisäksi monia bakteereita on eristetty hedelmämehuista, kuten maitohappobakteereita (*Lactobacillus* ja *Leuconostoc*), etikkahappobakteereita (*Gluconobacter* ja *Acetobacter*) sekä itiöitä muodostavia bakteereita, kuten *Bacillus coagulans*ia, *Clostridium butyricum*ia ja *Clostridium pasteurianum*ia, joita on löydetty pilaantuneista virvoitusjuomista. Tietyt hiiva ja bakteerit voivat toimia indikaattoriorganismeina huonoista hygieniakäytännöistä virvoitusjuomien ja hedelmämehujen tuotannossa. Tällaisia organismeja ovat esimerkiksi *Rhodotorula glutinis* -hiiva ja *Bacillus*-suvun itiöivät bakteerit. (ICMSF 1998; Wareing ja Davenport 2007)

2.4.1 Mehujen ja virvoitusjuomien pilaantuminen

Hiivat ovat mehujen ja virvoitusjuomien suurin pilaajaryhmä, koska ne voivat kasvaa anaerobisesti happamassa ympäristössä. Hiivojen ravinnontarve on vähäinen ja ne voivat syntetisoida tarvitsemiaan ravinteita kasvua varten. Koteloitiöitä (acrospore) muodostavat hiivat voivat olla hyvin lämmönkestäviä, ja näihin kuuluvat esimerkiksi *Saccharomyces*-, *Zygosaccharomyces*- ja *Pichia*-hiivat. Koteloitiöitä muodostavat hiivat ovat kuitenkin paljon vähemmän lämmönkestäviä, kuin bakteeri-itiöt. Hiivakontaminaatio voi aiheuttaa tuotteen samentumista, saostumia ja pahanhajuisuutta. *Zygosaccharomyces bailii* on tärkein mehujen pilaantumista aiheuttava hiiva, joka voi tehokkaasti fermentoida glukoosia ja fruktoosia (ICMSF 1998). Hiivojen lisäksi homeet ovat kasvuympäristöltään vähän ravinteita vaativia, mutta ne ovat kuitenkin ehdottoman aerobisia. Mehujen matala redox-potentiaali ja matala happipitoisuus rajoittavat homeiden kasvua, mutta jotkin homeet ovat enemmän lämmönkestäviä kuin hiivat. Homeet aiheuttavatkin pilaantumista lähinnä silloin, jos tuotteeseen pääsee happea (ICMSF 1998).

Bakteereista vain maito- ja etikkahappobakteerit voivat kasvaa mehuissa ja virvoitusjuomissa (ICMSF 1998). *Gluconobacter (Acetomonas)* -lajit ovat tärkeimpiä mehujen pilaajabakteereja, koska ne voivat kasvaa alhaisessa pH:ssa (3,0-3,5) ja niillä on vähäinen ravinnontarve, mutta ne vaativat kuitenkin happea kasvaakseen. *Lactobacillus*- ja *Leuconostoc*-lajeja on eristetty pilaantuneista virvoitusjuomista, ja joskus ne esiintyvät tuotteissa sekundäärisenä kontaminaationa prosessin aikana. Useimmat *Lactobacillus*-lajit ovat heterofermentatiivisia ja ne käyttävät sokeria hiilidioksidin, etikkahapon ja etanolin tuottamiseen. Virvoitusjuomissa maitohappobakteerien kasvu aiheuttaa värimuutoksia ja hiilidioksidin muodostumisen myötä paineen kasvua, joka voi toisinaan johtaa pakkausten vioittumiseen. Jotkin *Lactobacillus*- ja *Leuconostoc*-lajit tuottavat dekstraaneja, jotka voivat muodostaa kumimaista limaa tuotteeseen. Diasetyylin muodostuminen aiheuttaa lisäksi maku- ja hajuhaittoja *Lactobacilluksen* kasvaessa. Etikkahappobakteerien kasvu muodostaa tuotteisiin myös samentumista ja värin ja aromin muutoksia. Hyvin lämpökestävät itiöitä muodostavat bakteerit, kuten *Bacillus acidoterrestus*, voivat pilata happamia ja pastöroituja omenamehuja. *Bacillus coagulansin* on lisäksi todettu pilaavan tomaattimehuja. *B. coagulans* germinoituu suhteellisen korkeissa lämpötiloissa, mutta sen on huomattu kasvavan myös noin 5-20 °C:een lämpötiloissa (ICMSF 1998).

2.4.2 Mehujen ja virvoitusjuomien patogeenit

Virvoitusjuomat, mehut ja mehutiivisteet aiheuttavat melko vähän mikrobiologisia terveysriskejä, koska patogeenit eivät kasva kovin happamissa oloissa. Ruokamyrkytyksiä tapahtuukin lähinnä silloin, kun pilaajamikrobit ovat muokanneet tuotteen neutraloimalla luontaiset hapot patogeeneille sopiviksi olosuhteiksi. Tomaattimehut ovat alttiimpia patogeenisten organismien kasvulle niiden suhteellisen korkean pH:n takia. Salmonella voi kasvaa pH-alueella 3,8-4,0 riippuen tuotteen hapon tyypistä ja lämpötilasta, ja esimerkiksi omenamehussa salmonella voi säilyä, mikäli pH on suuri, varastointilämpötila on alhainen tai tuotteen sokeripitoisuus on suuri. Enterohemorraginen *Escherichia coli* O157:H7 on aiheuttanut epidemioita pastöroimattomien omenamehujen välityksellä. (ICMSF 1998)

Homesienten kasvu hedelmämehuissa voi tuottaa mykotoksiineja tuotteisiin. *Penicillium expansum* voi tuottaa patuliinia omena- ja päärynämehuihin ja *Penicillium citrinum* sitriiniä kivennäisvesiin. Patuliinin on kuitenkin todettu olevan vain vähän myrkyllinen ihmisille, mutta sen läsnäolon tuotteissa on todettu johtuvan huonolaatuisista hedelmistä mehujen tuotannossa. WHO on asettanut patuliinin maksimipitoisuudeksi 50 mg/kg hedelmäpohjaisissa tuotteissa. (ICMSF 1998)

2.4.3 Pastöroidut juomat

Lisäaineita sisältämättömät hedelmämehut pastöroidaan yleensä alle 90 °C:ssa. Pastöroitujen tuotteiden pilaantumisen aiheuttavat tavallisesti itiitä muodostavat bakteerit, koteloitioista muodostuvat hiivat ja lämpökestävät homeet (Lawlor 2009). Itiitä muodostavien *Bacillus*- ja *Clostridium*-suvun bakteerien kasvu yleensä estyy happamissa virvoitusjuomissa, mutta niiden itiöt voivat säilyä elinkelpoisina (Kregiel 2015). Itiöiden tappaminen on vaikeaa perinteisillä kuumennuskäsittelyillä, ja esimerkiksi sterilointi 121 °C:ssa alentaa tehokkaasti *Geobacillus stearothermophiluksen* vegetatiivisolujen selviytymistä. Sterilointiaikaa on kuitenkin lisättävä 10-20 minuuttia, jotta *G. stearothermophiluksen* itiöt tuhoutuisivat (Kriegel 2015). *Alicyclobacillus*-suvun itiitä muodostavia bakteereita on myös eristetty pilaantuneista hiilihapotetuista virvoitusjuomista ja muista hedelmämehuista. Tärkein *Alicyclobacillus*-suvun kontaminantti pastöroiduissa mehuissa on termotolerantti *A. acidoterrestris*, jonka itiöt voivat germinoitua ja kasvaa alle 4 pH-arvossa. Kuitenkin esimerkiksi pastöroidun tuotteen jäädyttäminen nopeasti alle 20 °C:seen, sorbiini- tai bentsoehapon

käyttäminen tai hiilidioksidin lisäys estää bakteeria pilaamasta tuotetta (Walker ja Phillips 2008; Wareing ja Davenport 2007).

2.5 Biofilmit elintarviketeollisuudessa

Useat mikrobit voivat tarttua erilaisiin eloperäisiin ja elottomiin pintamateriaaleihin ja muodostaa biofilmiä. Mikrobisolut tarvitsevat ravinteiden lisäksi hieman nestettä, jotta biofilmi voi muodostua. Biofilmissä mikrobit saavat ravinteita helpommin, kuin esimerkiksi vähä-ravinteisessa nesteessä, jonka takia ne viihtyvät paremmin erilaisilla pinnoilla. Pintojen lisäksi mikrobisolut kiinnittyvät biofilmissä myös toisiinsa, ja niiden kasvu ja esimerkiksi geenien säätely poikkeaa normaaleissa olosuhteissa elävistä soluista. Biofilmi koostuu mikrobisolujen lisäksi polysakkaridirihamastoista ja glykoproteiineista. Biofilmin mikrobisto on usein hyvin monimuotoinen, ja se voi koostua samanaikaisesti sekä aerobisista, että anaerobisista mikrobeista. Solujen kehittyminen biofilmissä ja niiden fenotyyppi voi muistuttaa bakteerien itiön muodostusta. Tuotantolaitteissa biofilmin muodostuminen voi vähentää lämmön siirtymistä ja nesteen virtausta sekä aiheuttaa korroosiota. Elintarviketeollisuudessa on paljon eloperäistä materiaalia, joten biofilmiongelmat ovat siellä yleisiä. Elintarviketeollisuudessa biofilmi voi heikentää tuote- ja vedenlaatua aiheuttamalla ristikontaminaatioita sekä kontaminaatioita tuotteiden jälkikäsittelyssä (Agle 2007; Storgårds 2000; Wirtanen ja Mattila-Sandholm 2002). Bakteerit voivat kiinnittyä pinnoille minuuteissa, mutta biofilmin kehittyminen kestää yleensä tunteja tai päiviä. Pitkän aikaa kertynyt biofilmi lisää sen paksuutta ja stabiilisuutta, sekä sitä on vaikeampi puhdistaa. Tällaisen vahvan rakenteen muodostanut biofilmi voi kehittyä yli 10 vuorokaudessa (Agle 2007; Storgårds 2000).

Biofilmin rakenne suojaa sitä antibakteerisilta aineilta, kuten desinfiointiaineilta, ja esimerkiksi kiertopesujärjestelmissä biofilmi suojaa sen sisältämiä mikrobeja pesu- ja puhdistusaineita vastaan. Biofilmissä olevat solut voivat lisäksi kestää paremmin UV-säteilyä. Biofilmin esiintyminen juomavesiputkistoissa on yleistä. Juomavesiputkistojen biofilmeistä on eristetty esimerkiksi *Flavobacterium*-, *Acinetobacter*-, *Bacillus*- ja *Pseudomonas*-suvun bakteereja. Biofilmin muodostumisen ehkäisy on tärkeää varsinkin elintarviketeollisuudessa, sillä biofilmi voi suojata patogeeneja ja pilaajamikrobeja. Jotkin patogeenit voivat lisäksi kasvaa biofilmissä, kuten esimerkiksi kiinteistöjen kuumavesijärjestelmistä eristetty *Legionella pneumophila* (Agle 2007; Wirtanen ja Mattila-Sandholm 2002). Biofilmin syntymisen ehkäiseminen on tärkeää myös antibioottiresistenssiongelman kannalta, sillä

bakteerit voivat tulla resistenteiksi erilaisille antibiooteille biofilmien kaltaisissa stressaavissa oloissa (Korkeala 2007).

Vesiputkistojärjestelmissä biofilmin muodostumista ehkäistään esimerkiksi veden säännöllisellä laadunvalvonnalla ja seurannalla orgaanisten ainesosien kertymisestä. Teollisissa vesijärjestelmissä biofilmin muodostumista seurataan valvomalla mikrobimääriä, saostumia ja korroosiota. Biofilmin muodostumiseen riittää esimerkiksi pieni määrä kondenssivettä, ja varsinkin elintarviketeollisuudessa biofilmit kasaantuvat paikkoihin, joihin puhdistustoimet eivät yllä. Elintarviketeollisuudessa on tärkeää oikeanlainen laitesuunnittelu esimerkiksi pintamateriaalien ominaisuuksien ja kunnossapidon kannalta. Ylipitkät putkistot ja mutkat voivat olla potentiaalisia biofilmien syntypaikkoja, koska ne eivät välttämättä tyhjene täysin käytettävästä nesteestä. Lisäksi esimerkiksi kumista valmistetut tiivisteet ovat otollisia mikrobien kiinnittymiselle. Jäähdytys- ja kiertovesijärjestelmissä biofilmien muodostumista voidaan estää käyttämällä prosessiin soveltuvaa biosidiä tai muuttamalla prosessin pH:ta. Bioteknisissä prosesseissa aseptisuus sekä laitteiden hyvä pestävyys ja säännöllinen desinfiointi ovat tärkeimpiä toimia biofilmien hallinnassa. (Storgårds 2000; Wirtanen ja Mattila-Sandholm 2002)

Elintarviketeollisuudessa biofilmiongelmia on havaittu esimerkiksi meijereissä, panimoissa ja sokerinjalostamoissa. Tutkimuksia panimoympäristöissä esiintyvistä biofilmeistä on julkaistu kuitenkin hyvin vähän. Oluen valmistuksessa biofilmiongelmia ovat kuitenkin merkittäviä varsinkin, mikäli tuotteita ei ole pastöroitu pakkauksissaan. Panimoissa esimerkiksi *L. brevis*- ja *Acetobacter*-lajeja sisältävää biofilmiä on eristetty pastörintilaitteistosta ja kuljettimilta, mutta eniten kontaminoituneet alueet on huomattu olleen täyttölaitteiston ympärillä. Biofilmeistä eristettyjä bakteereja ovat esimerkiksi *Pseudomonas*-, *Enterobacter*-, *Lactobacillus*- ja *Bacillus*-sukuun kuuluvat bakteerit sekä hiivoista esimerkiksi *Candida*-, *Rhodotorula*- ja *Saccharomyces*-suvun hiivat (Storgårds 2000). Moretro ym. (2003) tutkivat elintarviketeollisuuden prosesseista eristetyn *Staphylococcus*-biofilmin muodostumista. Kantojen huomattiin muodostavan paksumpaa biofilmiä silloin, kun glukoosia lisättiin ravinteeksi kasvatuspinnalle (Agle 2007).

Hygieeniset tuotantotavat ja laitesuunnittelu ovat tärkeitä biofilmin muodostumisen ehkäisyssä. Elintarvikkeiden säilytystankkien, putkistojen ja tuotantovälineiden materiaaleihin ja kuntoon tulee kiinnittää huomiota. Elintarvikkeen kanssa kosketuksissa olevien pintojen tulee olla lisäksi helposti pestävissä. Erityisesti erilaiset venttiilit voivat aiheuttaa

merkittäviä kontaminaatoriskejä nestemäisille tuotteille. Panimoissa oluiden täyttökoneiden tulisi olla helposti pestävissä, eikä nestettä saisi jättää tuotantolaitteistojen pinnoille. Pullo-tuksessa ilmanlaadun tulee olla mikrobiologisesti hyvä, ja laitteiston sijainti vaikuttaa oleellisesti ilmanlaatuun. Esimerkiksi pullojen pesulaitteiston tulisi olla kauempana täyttökoneesta, koska pesulaitteisto tuottaa lämpöä ja kosteutta ympäristöön. (Storgårds 2000)

Yleisesti kemialliset puhdistusaineet ovat desinfiointiaineita tehokkaampia poistamaan pinnoille tarttuneita bakteereja. Krysinskin ym. (1992) tutkimuksessa biofilmin täydellinen poistaminen vaati biofilmin kemiallisen pesun ennen desinfiointiaineen käyttöä. Biofilmin kontrollointi vaatiikin siten pintojen käsittelyä pesuaineilla desinfiointiaineiden lisäksi. Holahin ja Gibsonin (1999) tutkimuksessa matalan pesulämpötilan huomattiin myös olleen tehoton poistamaan biofilmejä (Storgårds 2000). Parkarin ym. (2004) tutkimuksessa testattiin erilaisten pesumenetelmien tehoa ruostumattoman teräksen pinnalla olleeseen biofilmiin, joka koostui itiöitä muodostavasta ja termofiilisestä *Bacillus flavothermuksesta*. Kemiallisen pesun emästä ja happoa käyttämällä huomattiin olleen tehokkain menetelmä biofilmin poistamiseksi (Agle 2007).

2.6 Luminometria prosessihygienian valvonnassa

Mikrobien kokonaismäärä määritetään yleensä esimerkiksi maljaviljely-, tai kontaktiagar-menetelmällä tai membraanisuodatusmenetelmällä, jotka takaavat toistettavia tuloksia. Näytteiden pitkän inkubointiajan takia menetelmät eivät kuitenkaan sovellu välittömään prosessihygienian tarkkailuun. Sharpe (1970) suositti bioluminesenssiperusteista ATP-mittausta (adenosiinitrifosfaatti) elintarviketeollisuuden tarpeisiin. Menetelmän suosia kasvaa edelleen hygienian tarkkailussa osana HACCP-systeemiä, koska se on hyvin nopea havaitsemaan mikrobiperäistä ja orgaanista likaa kohteesta. Elintarviketeollisuudessa kasvi- ja eläinperäiset raaka-aineiden jäämät pinnoilla voivat nostaa mitattuja ATP-arvoja. Puhtauden ja hygienian kannalta ei ole kuitenkaan oleellista, onko lika eläviä mikrobeja vai biologista materiaalia, kuten esimerkiksi mehua. Mikrobiton pinta ei takaa puhtautta, koska orgaaninen lika on erinomaista ravintoa mikro-organismeille ja se voi johtaa tuotteiden kontaminaatioon. Tämän takia tulokset ilmoitetaan yleensä RLU-yksiköissä (Relative Light Unit) ATP:n konsentraation sijasta, ja tuloksia verrataan ennalta määrättyihin raja-arvoihin. ATP-mittausta käytetään hygienian tarkkailuun useimmiten meijeri- ja lihateollisuudessa sekä virvoitusjuomien, mehujen ja oluen valmistuksessa. ATP-mittausta käytetään lisäksi esimerkiksi lasi- ja muovipakkausten puhtauden tarkkailuun (Pistelok 2016).

Elintarviketeollisuudessa ATP-mittausten RLU-arvoa >10 pidetään kriittisenä rajana, jolloin hyvien hygieniakäytäntöjen mukaan kohde on puhdistettava ennen uusintanäytteenottoa.

Mikrobikriteeriasetuksessa ei säädetä pintapuhautusnäytteiden analyysimenetelmistä, mutta ATP-mittauksella voidaan validoida pintojen pesu- ja desinfiointimenetelmien toimivuus, mikäli laitteen käyttöohjeita noudatetaan (Evira 2017). EU-direktiivin (92/46) mukaan ATP-mittaus on validi menetelmä esimerkiksi meijeriteollisuuden pintapuhautusnäytteille sekä sitä suositellaan myös hyvänä hygieniakäytäntönä panimo- ja virvoitusjuomayhdistysten toimesta (Orth 1998). Poulis ym. (1993) tutkivat elintarviketeollisuuden hygienianäytteitä vertailemalla ATP-mittausten tuloksia ja perinteisiä mikrobiologisia viljelytekniikoita keskenään. Näytteet kerättiin elintarvikkeiden prosessointipinnoilta eri elintarviketeollisuuden aloilta ja viljelyt tehtiin usealle erilaiselle kasvatusalustalle. Tutkimuksessa ei huomattu korrelaatiota ATP-mittausten tulosten ja kasvatusalustojen pesäkemäärän välillä. Tulosten perusteella todettiin, että ATP-mittauksen tulokset eivät ole suoraan verrannollisia elinkelpoisten mikrobien määrään. ATP:n määrän huomattiin vaihtelevan huomattavasti, mikä saattoi johtua mikrobien tyypistä ja fysiologisista olosuhteista, ATP:n läsnä olosta muualta kuin mikrobiologisesta lähteestä tai ATP-mittauksen herkkyydestä. Vaikka menetelmien välillä ei huomattu korrelaatiota määrittämään mikrobiologinen kontaminaatio näytteestä, molempien menetelmien todettiin kuitenkin olevan luotettava määrittämään pesu- ja desinfiointimenetelmien tehokkuus elintarviketeollisuuden prosesseissa.

3 KOKEELLINEN TUTKIMUS

3.1 Tutkimuksen tavoite

Työn kokeellisen osuuden tavoitteena oli tutkia kokonaisvaltaisesti R1-pullotuslinjan prosessihygieniää hyödyntäen perinteisiä mikrobiologisia menetelmiä mikrobien kasvatuksessa ja näytteenotossa. Tämän työn suuren näytemäärän vuoksi mikrobeja kasvatettiin ainoastaan aerobisesti ja alustoilla käytettiin kahta erilaista kasvatuslämpötilaa. Työn myöhemmässä vaiheessa pyrittiin identifioimaan bakteereja, joiden todettiin esiintyvän usein tuotteiden mikrobiologisissa analyyseissä.

3.2 Materiaalit ja menetelmät

3.2.1 Tutkimuksessa käytetyt mikrobien elatusalustat

Tämän tutkimuksen mikrobiologisissa analyyseissä kasvatusalustoina käytettiin pääasiassa Altia Oyj:n Rajamäen mikrobiologian laboratoriossa nykyisin käytössä olleita alustoja, joiden tiedot ovat koottuna liitteessä 1. Tutkimuksen tavoitteena oli myös testata erilaisia juomateollisuuden laaduntarkkailuun soveltuvia mikrobien kasvatusalustoja. Uutena elatusalustana päätettiin käyttää kaupallista TSA-alustaa (tryptoni-soija-agar), koska se ravintorikkaana mediumina soveltuu monenlaisten aerobisten ja anaerobisten mikrobien viljelyyn sekä sitä käytetään laajalti myös muualla elintarviketeollisuudessa (Entis 2002). Ravinteita enemmän vaativat mikrobit kasvavat paremmin TSA-maljalla, kuin esimerkiksi kokonaispesäkkeiden määrittämiseen tarkoitettulla PCA-alustalla (Plate Count Agar) tai hiivojen ja homeiden kasvatukseen tarkoitettulla MEA-alustalla (Malt Extract Agar, mallasuuteagar), joiden koostumus on ravinneköyhempi.

Tutkimuksessa testattiin myös MEA-alustaa, johon oli lisätty 0,5 % (w/w) etikkahappoa. Mallasuuteagarilla, johon on lisätty etikkahappoa (MAA, Malt Acetic Acid Agar), voidaan kasvattaa säilöntäaineresistenttejä hiivoja (ICMSF 1998). MAA-alustaa käytettiin pääsääntöisesti tuotteen C mikrobiologisiin analyyseihin. Tilojen ja laboratoriovälineistön puutteen vuoksi hiivojen ja homeiden kasvatukseen tarkoitettuja elatusalustoja inkuboitii huoneenlämmössä ja bakteerikasvatusalustoja lämpökaapissa +30 °C:ssa. Inkubointiajat jokaiselle alustalle on listattu liitteessä 1. Työn kaikkia kasvatusalustoja inkuboitii aerobisesti.

Spesifiseksi elatusalustaksi homeiden ja hiivojen kasvatukseen valittiin elintarviketeollisuudessa paljon käytetty OGYE-agar (Oxytetracycline Glucose Yeast Extract), johon oli lisätty NMKL:n (Pohjoismaiden elintarvikkeiden metodiikkakomitea) menetelmäohjeen (98/2005) mukaisesti 100 mg/l oksitetrasykliiniä. Tutkimuksessa testattiin myös kloramfenikolin käyttöä hiivojen ja homeiden kasvatukseen PCA- ja TSA-maljoilla. Kloramfenikolia lisättiin 100 mg per litra agaria. Bakteerien kasvatukseen käytettiin sienikasvustoa estävää sykloheksimidiä 20 mg/l PCA- ja TSA-alustoilla. Testattujen antibioottien tiedot on koottu liitteeseen 1. Antibiootteja punnittiin tarvittava määrä Eppendorf-putkiin ja ne liuotettiin 2 ml:aan DMSO:ta (dimetyylisulfoksidi) tai 96 %:sta etanolia. Liitteessä 1 on listattuna liuottimet jokaiselle käytetylle antibiootille. Antibiootit lisättiin jäähtyneeseen agariin autoklavoinnin jälkeen käyttäen 0,2 µm:n steriilisuodattimia.

3.2.2 Tuotteiden mikrobiologiset analyysit

Tuotteiden A, B, C ja D (liite 5, toimitettu ainoastaan Altia Oyj:n käyttöön) mikrobiologiset analyysit suoritettiin Altia Oyj:n Rajamäen mikrobiologian laboratoriossa. Tuotteiden analysointiin käytettiin Altia Oyj:n normaaleja laadunvalvontaan käytettyjä menetelmiä. Tuotteita suodatettiin pääsääntöisesti 100, 50 ja 10 ml 0,45 µm:n membraanisuoatinkalvon (Pall Corporation GN-6 Metricel®) läpi. Tutkimuksessa käytettävillä tuotteilla 100 ml:n suodattavuus on Altia Oyj:n normaaliin laadunvalvontaan kuuluva määrä, mutta toistettavuuden ja mahdollisen suuren pesäkemäärän vuoksi tuotteita suodatettiin myös 50 ja 10 ml. Bakteerien kasvattamiseksi näytteitä inkuboitii +30 °C:ssa kolme vuorokautta PCA- ja TSA-alustoilla sekä viisi vuorokautta WLN-alustalla (Wallerstein Nutrient Agar). WLN-alusta sisältää indikaattoria, jonka avulla voidaan huomata happoa muodostavat mikrobit. Homeiden ja hiivojen kasvattamiseksi näytteitä inkuboitii huoneenlämmössä noin +20-25 °C:ssa neljä vuorokautta MEA-maljoilla. Tutkimuksen myöhemmässä vaiheessa käyttöön otettiin myös antibioottikasvatusalustat tuotteiden mikrobiologisia analysointeja varten. Spesifisissä kasvatuksissa käytettiin pääsääntöisesti OGYE-agaria hiivojen ja homeiden tarkastelemiseksi sekä sykloheksimidiä sisältävää PCA-alustaa bakteerien analysoimiseksi.

Tuotteiden mikrobiologiset analyysit tehtiin lähes välittömästi pullotuksen jälkeen. Tutkimuksessa pyrittiin tekemään analyysit aina pullotuserän alussa ja lopussa sekä muutaman tunnin kuluttua prosessin alkamisesta, riippuen siitä, kuinka paljon pullotettavaa tuotetta oli ja kuinka sujuvasti tuotetta valmistui.

3.2.3 Hygienianäytteiden mikrobiologiset analyysit

Hygienianäytteitä kerättiin pääasiassa ennen pullotusprosessin alkua, mutta näytteitä otettiin myös prosessin aikana mahdollisuuksien mukaan. Hygienianäytteiden kohteet ja menetelmät on esitetty liitteessä 2. R1-pullotuslinjastolta otettuja pintasivelynäytteitä kerättiin pääsääntöisesti yhdessä ATP-mittausten kanssa, jotta tuloksia voitiin verrata keskenään.

Hygienianäytteiden otossa sovellettiin Altia Oyj:n hygieniakäytäntöjä, missä mikrobien kasvatusalustoina käytettiin PCA- ja MEA-alustojen lisäksi TSA-alustaa. Myöhemmässä vaiheessa myös hygienianäytteitä kasvatettiin spesifisillä antibioottimaljoilla. Pintasivelynäytteiden otossa steriilissä vedessä kostutetulla pumpulipuikolla kerättiin näyte kohteesta ja

puikko liotettiin 1 ml:aan steriiliä vettä. Liuoksesta pipetoitiin 0,1 ml näytettä kasvatusalustoille. PCA- ja TSA-maljoja inkuboitiin +30 °C:ssa kolme vuorokautta ja MEA-maljoja huoneenlämmössä neljä vuorokautta. Myöhemmässä vaiheessa liotusliuoksena testattiin myös NMKL:n menetelmäohjeen (Nro 5/2001) mukaista NaCl-peptoni-liuosta sekä 0,9 % fysiologista suolaliuosta.

R1-pullotuslinjastolta kerättyjen tyhjien pullojen mikrobiologisessa analysoinnissa pulloihin lisättiin steriiliä vettä, jota suodatettiin 100 ml membraanisuodatinkalvon läpi. Pullojen korot ja kapselit liotettiin 100 ml:ssa steriiliä vettä, joka myös suodatettiin membraanisuodatinkalvon läpi. Kalvot siirrettiin PCA-, TSA- ja MEA-alustoille ja niitä inkuboitiin kuten muitakin hygienianäytteitä.

Tutkimuksessa testattiin myös Envirocheck-kontaktiliuskoja (Contact YM(R) Envirocheck®) ottamalla näytteet pääasiassa R1-pullotuslinjaston huuhtelu- ja täyttöpilleistä. Kontaktiliuskat olivat hiivojen ja homeiden kasvatusta varten, ja niitä inkuboitiin valmistajan ohjeiden mukaan +30 °C:ssa, ja pesäkkeet laskettiin päivittäin.

Tyhjien pullojen huuhtelunesteestä (25 % etanoli-vesiseos) kerättiin näytteitä pääsääntöisesti pullotusprosessin aikana muutaman tunnin välein sekä välittömästi uuden huuhteluneste-erän valmistuksen jälkeen. Huuhtelunestettä suodatettiin 100 ml PCA-, TSA-, MEA- ja WLN-alustoille ja maljoja inkuboitiin kuten muitakin hygienianäytteitä. Mikrobiologisten analyysien lisäksi huuhtelunesteen alkoholipitoisuuden muutosta seurattiin samoissa aikapisteissä viljelyjen kanssa, jolloin voitaisiin huomata alkoholipitoisuuden vaikutus mikrobien pesäkemäärään. Alkoholipitoisuus määritettiin mittaamalla huuhtelunesteen ominaispaino Anton Paar DMA 5000M -tiheysmittarilla. Myös pastörintilaitteen desinfektioai-
neesta tehtiin mikrobiologiset analyysit, kun aine oli kiertänyt laitteistossa noin 2 tuntia.

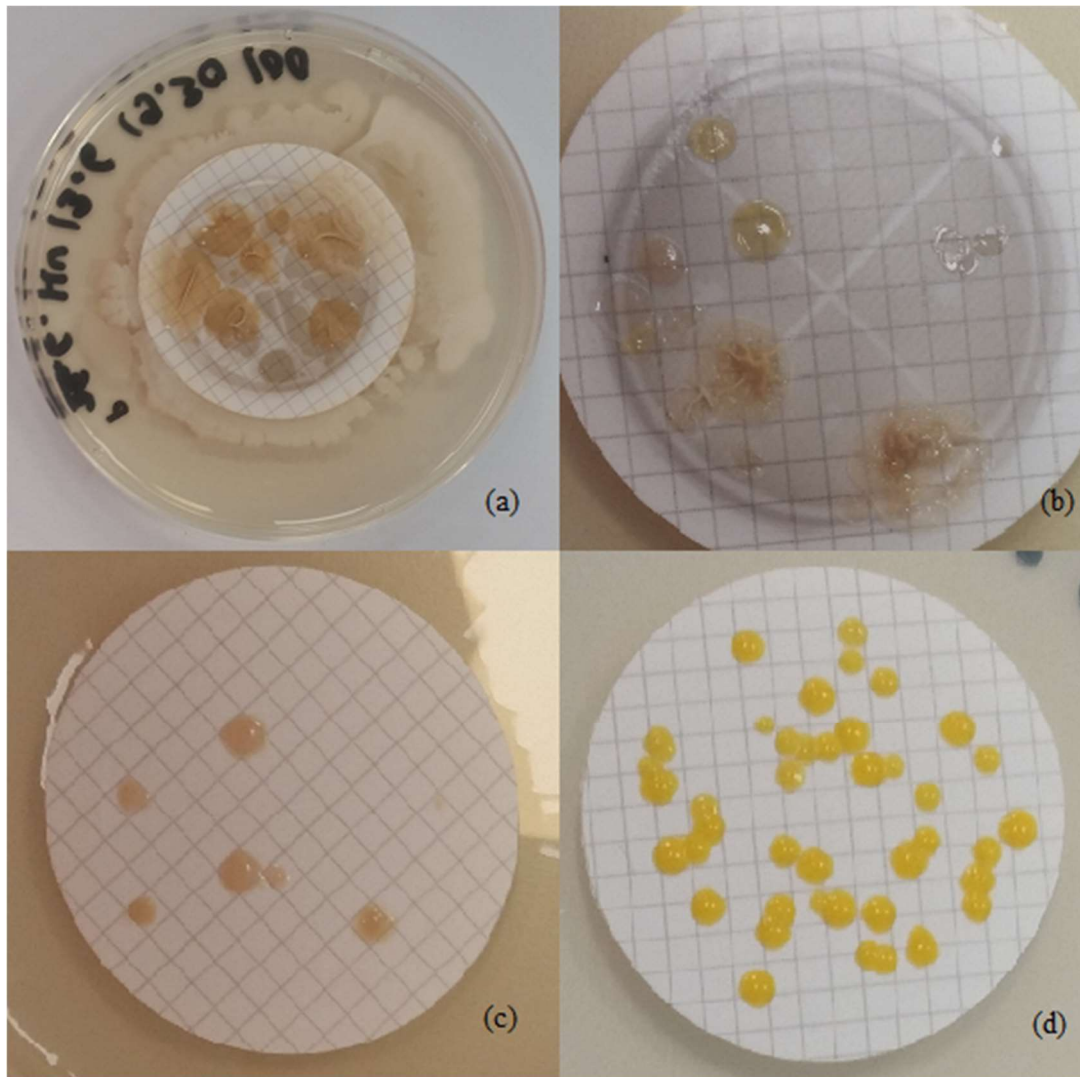
Laskeumamaljoja käytettiin pullotusprosessin aikana pullotuskoneen ilman likaantumisen seurantaan, mutta myös pullotuslinjan ympäristön ilman mikrobiologisen laadun seurantaan. Laskeumamaljojen annettiin olla kohteessa kansi auki yhden tunnin ajan, jolloin maljalle kertyneen mikrobimäärän arvioidaan vastaavan noin 1 m³:n ilmatilavuutta. Talviaikaan normaali huoneilma sisältää mikrobeja noin 10³ pmy/m³, jota pidetään hyvän ilmanlaadun maksimiarvona. Kohonnut bakteeripitoisuus (> 4500 pmy/m³) viittaa kuitenkin puutteelliseen ilmanvaihtoon (Sosiaali- ja terveysministeriö 2003). Laskeumamaljoina käytettiin pääsääntöisesti PCA-, TSA- ja MEA-maljoja.

3.2.3.1 Rikastusmenetelmä

Hygienianäytteiden tulosten perusteella päätettiin testata rikastusliemen käyttöä näytteiden analysoinnissa. Rikastusmenetelmän tarkoituksena oli tutkia, oliko tutkituissa kohteissa eläviä organismeja. Menetelmällä pyrittiin elvyttämään mahdolliset stressaantuneet solut esimerkiksi pestyiltä ja desinfioituilta pinnoilta. Rikastusliemenä käytettiin YM-lientä (YM Medium Broth), joka on tarkoitettu hiivojen ja homeiden kasvattamiseen. Rikastuslientä pipetoitiin 10 ml steriloituihin koeputkiin. Näytteet kerättiin pääasiassa huuhtelu- ja täyttökoneen pilleistä ja tarttujista pintasivelymenetelmällä. Pumpulipuikot siirrettiin aseptisesti rikastuslientä sisältäviin koeputkiin ja näytteitä inkuboitiin +30 °C:ssa 1-5 vuorokautta. Rikastusliemistä pipetoitiin 0,1 ml näytettä elatusalustoille, jolloin voitiin esimerkiksi tarkastella pesäkkeiden ulkonäköä kasvatusalustojen normaalien inkubointiaikojen jälkeen.

3.2.4 Mikrobin identifiointimenetelmät

Tämän työn molekyylibiologiset tutkimukset suoritettiin Helsingin yliopiston Biokeskus 1:sen ympäristömikrobiologian laboratoriossa. Tutkittujen mikrobin geenisekvensointi tapahtui ulkoistetusti Biotekniikan instituutin sekvensointipalvelussa. Tunnistukseen valittiin organismit (kuva 1), joiden huomattiin esiintyvän usein varsinkin tuotteiden A ja C mikrobiologisissa analyyseissä. Tunnistettavat mikrobit eristettiin kasvatusmaljoilta ja ne siirrettiin uusille elatusalustoille puhdasviljelminä. Puhdasviljelmien elatusalustoina testattiin erilaisia antibioottia sisältäviä maljoja, jolloin voitiin päätellä, että eristetyt mikrobit olivat bakteereja.



Kuva 1. (a) Tuotteen C mikrobiologisissa analyyseissä esiintyvä vaalea ja nopeasti leviävä kasvusto PCA-alustalla, minkä todettiin säilyvän pulloitetussa tuotteessa usean kuukauden ajan (näyte 1). (b) Tuotteen C analyyseissä esiintyvä ruskea, limainen ja epäsäännöllinen kasvusto TSA-alustalla (näyte 2). (c) Tuotteen A analyyseissä satunnaisesti esiintyvä vaaleanruskea pesäke TSA-alustalla, minkä havaittiin säilyvän pulloitetussa tuotteessa vähintään yhden kuukauden ajan (näyte 3). (d) Tuotteen A analyyseissä usein esiintyvä keltainen pesäke PCA-alustalla. Samankaltaista pesäkettä huomattiin esiintyvän yleisesti myös hygienia-näytteissä ja esimerkiksi 67 S -nestesokerissa (näyte 4).

Helsingin yliopiston ympäristömikrobiologian laboratoriossa suoritettiin eristettyjen bakteerien kokonais-DNA:n eristys käyttämällä kaupallista QIAGEN DNA Isolation Kit -reagenssipakkausta. DNA-eristys tehtiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Kokonais-DNA:sta oli tarkoitus monistaa PCR:llä (polymeraasiketjureaktio) noin 1500 emäsparin mittaisia jaksoja bakteerien 16S rRNA -geeneistä. Monistuksen onnistuminen varmistettiin geelielektroforeesijajolla, ja saatu DNA puhdistettiin QIAquick PCR Purification Kit -reagenssipakkauksen avulla valmistajan ohjeiden mukaisesti. Puhdistetut PCR-tuotteet lähetettiin Biotekniikan instituuttiin geenisekvensointia varten.

Bakteerien 16S rRNA-geenin monistusta käytetään yleisesti bakteerien identifiointiin, koska 16S rRNA esiintyy lähes kaikilla bakteereilla ja esimerkiksi geenin koko on riittävän iso ollakseen informatiivinen. Konservoituneen 16S rRNA:n emäsjärjestys sopii hyvin bakteerien fylogeneettiseen luokitukseen. 16S rDNA -menetelmää käytetäänkin usein tapauksissa, joissa tunnistettavan kohdeorganismien lajista tai suvusta ei tiedetä mitään. Joidenkin lajien kohdalla menetelmällä voi olla hankalaa erotella organismit fylogeneettisesti toisistaan, mistä hyvänä esimerkkinä ovat *Bacillus*-suvun bakteerit; esimerkiksi *B. globisporuksen* ja *B. psychrophiluksen* 16S rRNA -geenit ovat 99,5 %:sti samanlaiset. (Janda & Abbott 2007; Macrae 2000)

16S rDNA-analyysin tarkkuus riippuu pääsääntöisesti alukkeiden valinnasta. Aiemmin bakteerien kloonamiseen ja sekvensointiin käytettiin konservoituneita laajan alueen PCR-alukkeita. 16S rDNA:n monistuksen onnistumisessa oleellisinta on kuitenkin sopivien alukkeiden käyttäminen, koska väärin alukeparien valinta voi johtaa kyseenalaisiin biologisiin johtopäätöksiin. (Klindworth ym. 2012)

3.2.4.1 PCR ja geelielektroforeesi

DNA:n eristyksen onnistuminen varmistettiin mittaamalla näytteiden DNA:n konsentraatio NanoDroTM -spektrofotometrillä. PCR-ajoa varten DNA-konsentraation on hyvä olla alle 100 ng/μl. PCR-ajoa varten valmistettiin kaksi erillistä master mix -käyttöseosta käyttäen kahta erilaista alukeparia, koska bakteerien ominaisuuksista oli hyvin vähän ennakkotietoa. Alukkeiksi valittiin 16S rRNA -yleisbakteerialukkeet pA 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' ja pH 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3', joilla oletuksena on tuottaa noin 1500 emäsparin mittaisia DNA-jaksoja (Edwards ym. 1989). Toisiksi alukkeiksi valittiin 341F- ja 1492R-alukkeet, jotka monistavat noin 1000 emäsparin mittaisia DNA-jaksoja PCR-reaktiossa. Master mix -käyttöseoksessa käytetyt reagenssit on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Master mix -käyttöseoksissa käytetyt reagenssit.

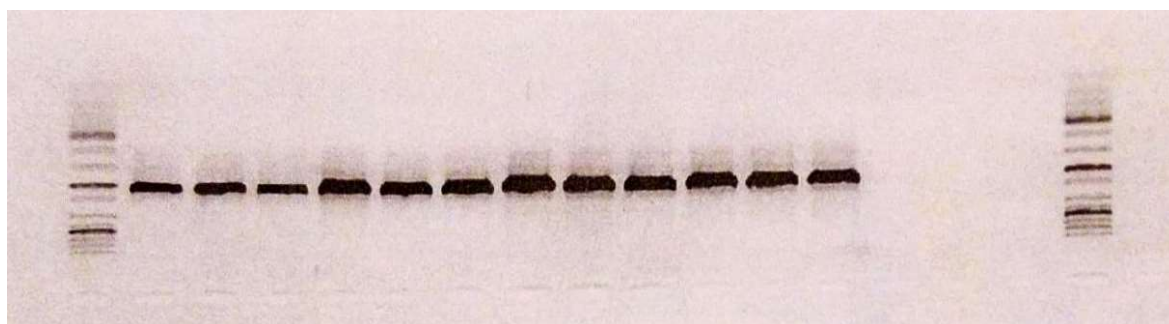
Master mix -käyttöliuos	Tilavuus (μl)
10 x PCR-puskuri	2,5
10 mM dNTP-seos	0,5
100 nM FW-aluke	0,25
100 nM RV-aluke	0,25
Taq-polymeraasi	0,5
Vesi (DDW)	20

Templaatti-DNA:ta lisättiin 1 µl jokaiseen reaktioon. Jokaiselle näytteelle tehtiin kolme rinnakkaista reaktiota ja molemmille käyttöliuoksille kolme negatiivista kontrollia. Alukkeille tehtiin kymmenkertainen laimennos. Lisäksi näytteitä 3 ja 4 laimennettiin myös kymmenkertaisesti, koska näiden alkuperäinen DNA-konsentraatio oli yli 100 ng/µl. PCR-ajo suoritettiin taulukon 2 ohjelman mukaisesti.

Taulukko 2. PCR-ohjelma vaiheittain.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika (min)
1. Alkudenaturaatio	98	0:30
2. Denaturaatio	98	0:15
3. Alukkeiden kiinnittyminen	60	0:45
4. Pidentymisvaihe	72	0:45
5. Syklit 2-4 24x		
6. Jäähdytys	4	∞

PCR-ajon onnistuminen varmistettiin geielektroforeesiajolla, jossa ajogeelinä käytettiin 1 g agarosia ja 100 ml TAE (Tris-Acetic acid-EDTA) -puskuria sisältävää seosta. Väriaineena käytettiin etiumbromidia nukleinihappojen visualisointiin. Elektroforeesin sähkökentän jännitteenä oli 100 V ja sähkövirran voimakkuus oli 400 mA. Geielektroforeesiajo kesti noin 30 minuuttia. Kuvassa 2 on esitetty DNA-juosteiden kulku agarosigeelissä.



Kuva 2. PCR:llä monistettujen DNA-juosteiden kulku agarosigeelissä pA- ja pH-alukkeilla. 341F- ja 1492R-alukkeilla tuotetta ei monistunut.

Geielektroforeesiajon jälkeen DNA puhdistettiin QIAquick PCR Purification Kit -reagenssipakkauksen avulla valmistajan ohjeiden mukaisesti. Puhdistuksen onnistuminen tarkastettiin mittaamalla DNA:n konsentraatio NanoDroTM -spektrofotometrillä. Lopuksi puhdistetut näytteet lähetettiin sekvensoitavaksi Biotekniikan instituuttiin.

3.2.4.2 Sekvenssien linjaus BLAST-ohjelmalla

Biotekniikan instituutin sekvensointipalvelu käsitti myös sekvenssien laadun tarkistuksen esimerkiksi vektoriperäisistä kontaminanteista. Sekvenssit toimitettiin FASTA-formaatissa. Sekvenssit linjattiin BLAST-ohjelmalla (Basic Local Alignment Search Tool) ja niitä verrattiin NCBI:n (National Center for Biotechnology Information) tietokantaan. BLAST on optimoitu löytämään paikallisia samankaltaisuuksia sekvenssien välillä, ja se vertailee nukleotidi- tai proteiinisekvenssejä erilaisiin sekvenssitietokantoihin sekä laskee tulosten tilastollisen merkitsevyyden (Madden 2013).

Koska bakteereista monistettiin niiden 16S rRNA-geenejä, käytettiin BLAST-tietokantana NCBI:n 16S ribosomaalisten RNA-sekvenssien tietokantaa, jolloin tunnistettavia nukleotidisekvenssejä verrattiin tietokannassa oleviin nukleotidisekvensseihin (Nucleotide BLAST). Linjauksen tavoitteena oli identifoida geenisekvenssit, joten BLAST-algoritmiksi valittiin megablast, joka sopii pitkille sekvensseille ja se etsii läheisesti samanlaisia ja samaan sukuun kuuluvia sekvenssejä (Madden 2013; Onkamo 2015).

Linjausten identtisyyden lisäksi tulosten tarkastelussa on tärkeää huomioida saatujen tulosten E-arvo, joka kuvaa linjauksen tilastollista merkitsevyyttä. Lisäksi on huomioitava, kuinka monta prosenttia analysoitava sekvenssi kattaa linjatuista sekvensseistä. Jos linjatun sekvenssin samankaltaisuus on vähintään 97 % tietokannassa olevan sekvenssin kanssa, voidaan tutkittavaa mikrobia pitää tyypillisesti samaan lajiin kuuluvana kantana. Tällöin tarvitaan kuitenkin lisätutkimuksia tarkempaa lajimäärittystä varten. (Muziasari 2018; Nguyen ym. 2016)

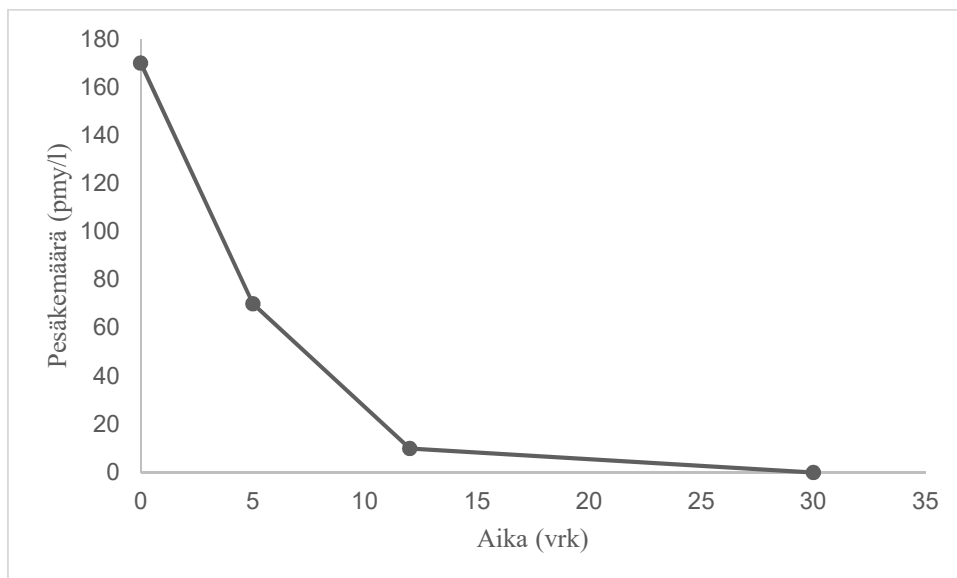
3.3 Tulokset

3.3.1 Tuotteet

Tuote A

Tuote A koostui kolmesta aromiltaan erilaisesta tuotteesta, jotka on nimetty Altia Oyj:lle toimitetussa liitteessä 5 tuotteina A1, A2 ja A3. Tuotteen A mikrobiologisten analyysien tulokset on esitelty Altia Oyj:lle toimitetussa liitteessä 6. Tuloksista voidaan huomata, että tuotteelle A tyypillistä mikrobiologista kasvua voitiin havaita lähes aina välittömästi pulloituksen jälkeen tehdyissä analyyseissä. Kuvassa 1 (d) on tuotteelle A ulkonäöltään tyypillisiä pesäkkeitä PCA-elatusmaljalla heti pulloituksen jälkeen otetuista näytteistä. Mikäli kasvustoa oli elatusalustoilla, sitä tavallisesti oli jokaisella kasvatuksissa käytetyillä alustoilla. Tuotteen A maultaan erilaisissa tuotteissa ei huomattu merkittävää eroa mikrobiologisessa laadussa tuotteiden välillä.

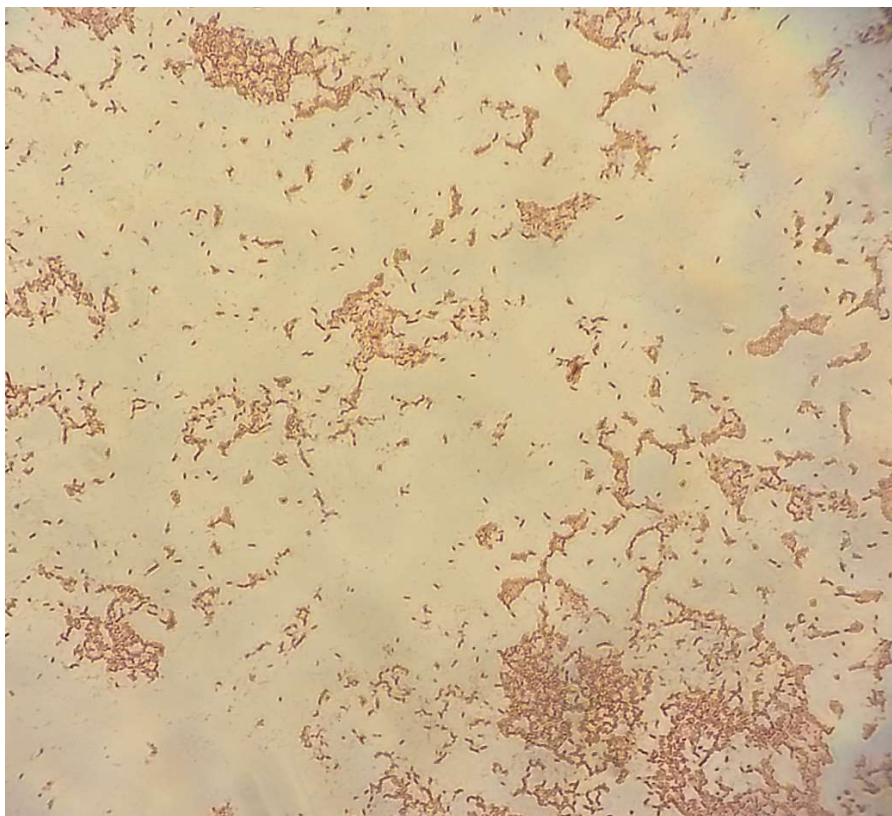
Kuvassa 3 on tyypillinen tuotteen A mikrobien kuolleisuutta kuvaava kaavio tuloksista, kun pesäkkeitä muodostavia yksiköitä PCA-maljalla oli 100-300 per litra tuotetta heti pulloituksen jälkeen tehdyissä analyyseissä (aikapisteessä 0 vrk). Kuvaajasta voidaan nähdä, että keskimäärin noin 5 vuorokauden jälkeen pulloituksesta kasvua oli alle 100 pmy/l ja 10 vuorokauden kuluttua enää noin 0-10 pmy/l. Myös muilla kasvatusalustoilla huomattiin samanlainen kehitys mikrobiologisissa analyyseissä. Tuotteen A havaittiin lisäksi sisältävän satunnaisesti happoa muodostavia mikrobeja. TSA-maljoilla mikrobikasvuston huomattiin olevan ulkonäöllisesti monipuolisempaa kuin muilla alustoilla; pesäkkeitä oli usein erivärisiä ja -kokoisia verrattuna muihin kasvatusalustoihin.



Kuva 3. Kuvaaja tuotteen A mikrobiologisesta seurannasta ajan funktiona. Mikrobin kuolleisuus oli tyypillisesti nopeaa ensimmäisten 10 vuorokauden aikana.

Tuotteen A tuloksista voitiin nähdä lisäksi, että mikäli kasvustoa oli paljon (yli 1000 pmy/l) heti pullotuksen jälkeisissä näytteissä, tai maljoilla kasvoi tietynlaista ruskeaa pesäkettä (kuva 1 (c)), kokonaispesäkkeiden määrä saattoi ensin vähetä, mutta lähteä uudelleen kasvuun useamman viikon jälkeen pullotuksesta analysoiduissa näytteissä. Mikäli kasvua havaittiin vielä kuukauden päästä pullotuksesta, otettiin uusintanäyte samasta pullotusajankohdasta. Missään uusintanäytteessä ei kuitenkaan huomattu mikrobiologista kasvua, joten kasvun voitiin olettaa olevan pullokohtaista.

Tuotteen A näytteitä viljeltiin myös spesifisille antibioottimaljoille bakteerien sekä hiivojen ja homeiden kasvattamiseksi. Pesäkkeille tehtiin lisäksi gram-värjäyksiä ja niitä tarkasteltiin valomikroskoopilla (kuva 4) organismien morfologian havainnoimista varten. Näin menetelmällä voitiin todeta kasvuston olevan bakteeria.



Kuva 4. Mikroskooppikuva PCA-alustalta poimitusta keltaisesta pesäkkeestä, jonka sauvamaiset bakteerit osoittautuivat gram-negatiivisiksi värjäytyen punaisiksi.

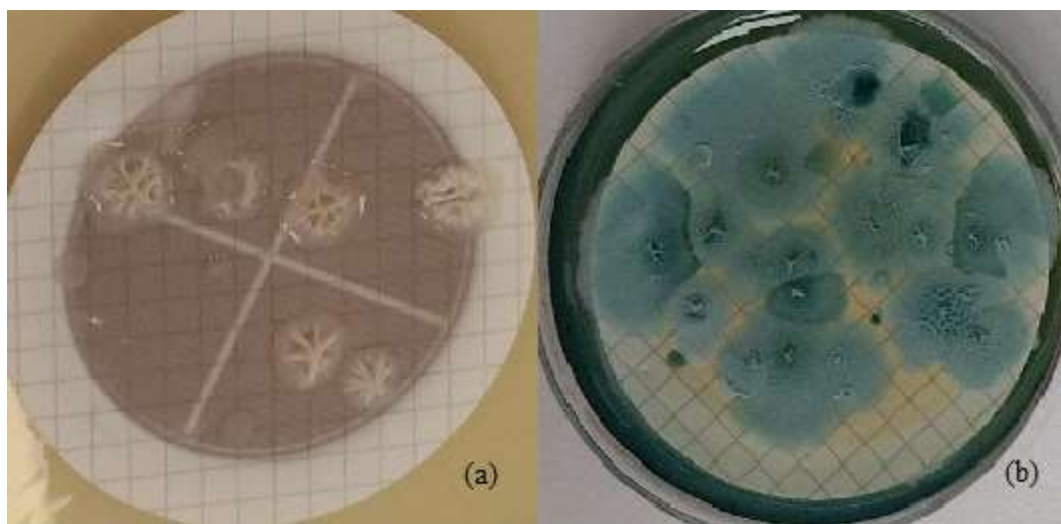
Tuote B

Tuote B koostui kahdesta eri tuotteesta, joissa raaka-aineina käytettävät viinit erosivat toisistaan. Altia Oyj:lle toimitetussa liitteessä 5 tuotteet on nimetty tuotteina B1 ja B2. Tuotteen B mikrobiologisten analyysien tulokset on esitelty Altia Oyj:lle toimitetussa liitteessä 6. Tuloksista voidaan huomata, että mikrobiologista kasvua ei ollut lähes ollenkaan välittömästi pullotuksen jälkeen otetuissa näytteissä. Mikäli kasvua oli, mikrobien huomattiin kuitenkin kuolevan viimeistään 10 vuorokauden kuluttua pullotuksesta. Kasvun huomattiin olevan tavallisesti samanlaista keltaista pesäkettä, kuten tuotteen A kohdalla. Tuotteen B alhaisen pH:n oletettiin vaikuttavan suuresti mikrobien selviämiseen tuotteessa.

Tuote C

Tuotteen B mikrobiologisten analyysien tulokset on esitelty Altia Oyj:lle toimitetussa liitteessä 6. Tuotteen C ensimmäisen ja toisen valmistuserän mikrobiologisten analyysien

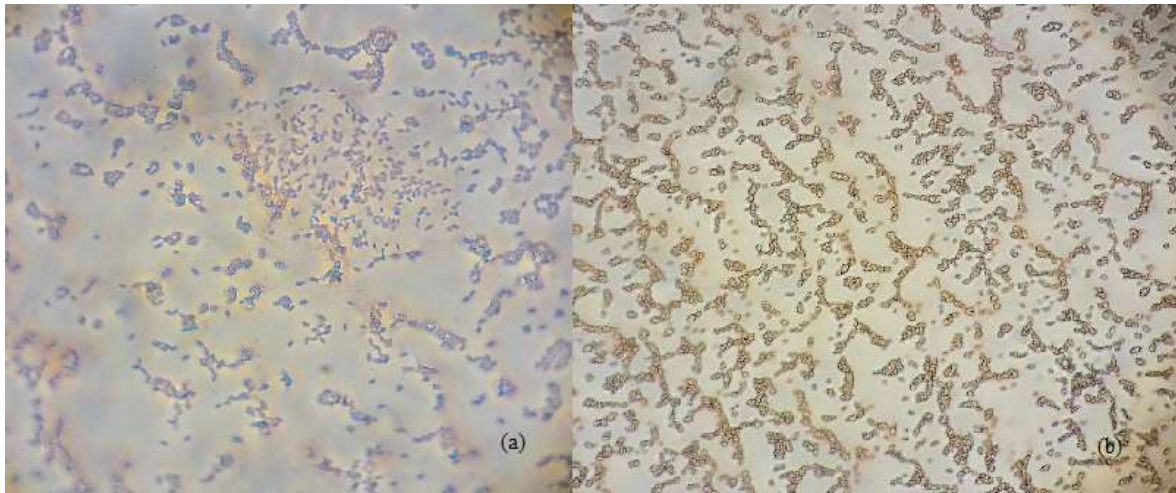
tulosten huomattiin poikkeavan hieman toisistaan, mikä todennäköisesti johtui erilaisista pastörintilämpötiloista erien välillä. Välittömästi pulloituksen jälkeen tehdyissä analyysissä huomattiin reilusti mikrobiologista kasvua jokaisella käytetyllä kasvatusalustalla. Tyypillinen kasvu PCA-maljalla on kuvassa 1 (a). PCA- ja TSA-maljoilla kasvun huomattiin olevan usein samanlaista koko kasvatusmaljan nopeasti täyttävää kasvustoa. MEA- ja WLN-alustoilla huomattiin kuvan 5 mukaista kasvua.



Kuva 5. Tuotteen C mikrobiologisten analyysien tyypilliset kasvustot MEA- ja WLN-alustoilla. MEA-alustoilla (a) muodostuneet pesäkkeet olivat usein vaaleita ja epäsäännöllisiä. WLN-alustalla (b) pesäkkeet olivat myös epäsäännöllisen muotoisia ja vihertäviä.

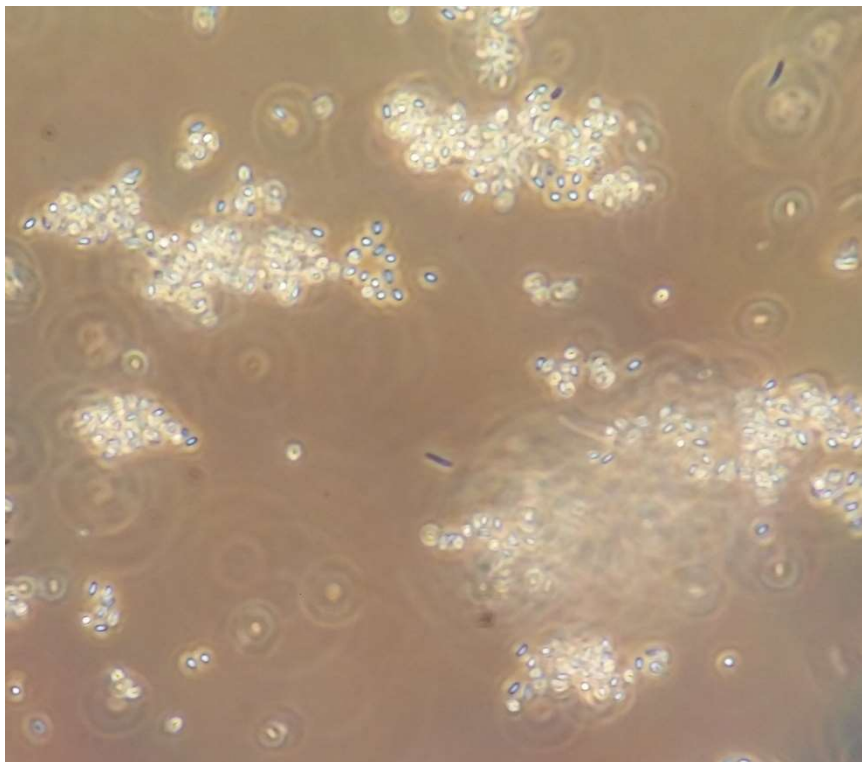
Tulosten perusteella tuotteen C mikrobiologisen kasvun huomattiin vähenevän hieman kuukausien aikana, mutta ensimmäisen valmistuserän seurantanäytteissä kasvua huomattiin olevan vielä neljän kuukauden jälkeen. Toisen valmistuserän mikrobiologinen kasvu oli hieman ensimmäistä erää vähäisempää, mikä johtui todennäköisesti tuotteen korkeammasta pastörintilämpötilasta, mutta tällöinkin kasvua huomattiin vielä kahden kuukauden jälkeen pulloituksesta. Myös toisen valmistuserän analyysissä huomattiin samanlaista nopeasti leviävää pesäkettä PCA- ja TSA-maljoilla, mikä huomattavasti vaikeutti pesäkemäärän luotettavaa laskemista kasvatusmaljoilta.

Myös tuotteen C näytteitä kasvatettiin spesifisillä antibioottimaljoilla, jolloin voitiin todeta tuotteen sisältävän ainoastaan bakteerikasvustoa. Tuotteen C mikrobiologisten viljelyiden tyypillisille kasvustoille tehtiin gram-värjäyksiä ja niitä tarkasteltiin valomikroskoopilla (kuvat 6 ja 7).



Kuva 6. TSA-alustalta poimitun epäsäännöllisen muotoisen ja vaalean pesäkkeen gram-värjätyt mikroskopointikuvat. Vasemmassa (a) kuvassa näyte värjäytyi violetiksi ollen gram-positiivinen. Näytettä mikroskopointiin yli viikon kasvatuksen jälkeen, ja kuvasta voidaan huomata yksittäisiä sekä ketjuja muodostavia bakteereja. Oikeassa (b) kuvassa samasta pesäkkeestä otettu näyte yli kahden viikon kasvatuksen jälkeen, jolloin näytteen ei huomattu enää värjäytyvän, mutta bakteerien huomattiin muuttavan muotoaan ja esiintyvän lähinnä ketjuissa.

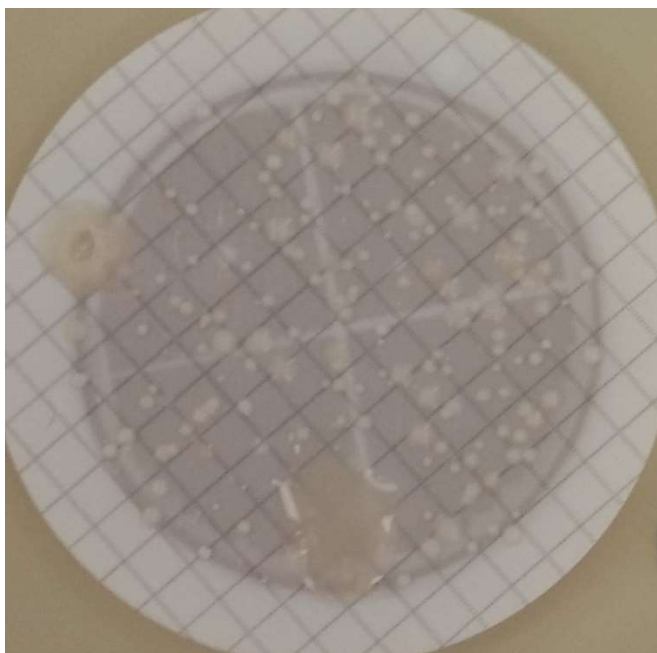
Kuvassa 7 on PCA-maljalta muutaman päivän kasvatuksen jälkeen poimittu näyte leviävästä kasvustosta. Mikroskopoinnissa huomattiin yksittäisiä ja ryhmässä esiintyviä soluja, mutta myös pitkiä sauvamaisia bakteereja, jotka pystyivät liikkumaan.



Kuva 7. Mikroskopointikuva PCA-alustalla leviävästä kasvustosta. Näytettä ei ollut gram-värjätty.

Tuotteen C raaka-aineet

Tuotteen C raaka-aineissa huomattiin paljon mikrobiologista kasvua (Altia Oyj:lle toimitettu liite 6). Testatuista raaka-aineista ainoastaan mustaviinimarjamehutiivisteeseen mikrobiologisissa analyyseissä ei havaittu kasvua. Elatusalustoilla kasvatettujen pesäkkeiden ulkonäkö oli kuitenkin usein hyvin erilainen yksittäisissä raaka-aineissa ja tuotteen C pastörintiin menevässä sekoitteessa (kuva 8), kuin valmiissa pullotetussa tuotteessa.



Kuva 8. MEA-alustalla kasvatettu näyte tuotteen C sekoitteesta. Pesäkkeet olivat tyypillisesti pyöreitä ja valkoisia. Satunnaisesti havaittiin kuitenkin samanlaisia ulkonäöltään epäsäännöllisiä ja limaisia pesäkkeitä, kuin valmiissa tuotteessa.

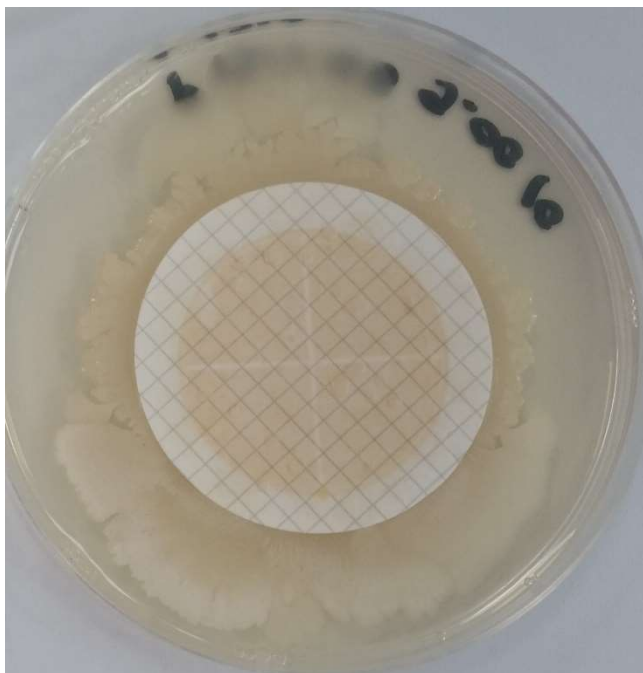
Nestesokerissa huomattiin satunnaisesti ulkonäöltään samankaltaista kasvustoa (kuva 9) kuin pullotetussa tuotteessa. Lisäksi nestesokerissa havaittiin kasvavan ulkonäöltään samankaltaisia keltaisia pesäkkeitä, kuten tuotteen A ja B mikrobiologisissa analyyseissä.



Kuva 9. 67 S -nestesokerin mikrobiologinen kasvu MEA-alustalla. Pesäkkeet olivat satunnaisesti samanlaisia epäsäännöllisiä ja vaaleita, kuten tuotteessa C. Nestesokerissa havaittiin tyypillisesti myös keltaisia ja muun värisiä pesäkkeitä.

Tuote D

Tuote D oli R1-pullotuslinjaston koe-erä, jonka tarkemmat tiedot on esitetty Altia Oyj:lle toimitetussa liitteessä 5. Tuotteen D mikrobiologisten analyysien tulokset ovat esitettynä Altia Oyj:lle toimitetussa liitteessä 6. Välittömästi pullotuksen jälkeen viljellyissä näytteissä huomattiin olevan reilusti mikrobiologista kasvua jokaisella käytetyllä elatusalustalla (kuva 10). Kasvun huomattiin olevan ulkonäöltään lähes samanlaista kuin tuotteen C analyysissä, joissa bakteerikasvusto levisi nopeasti maljalla, mikä vaikeutti oleellisesti pesäkkeiden määrän laskemista. Seurantänäytteissä kasvua huomattiin olevan paljon vielä kolmen kuukauden jälkeen pullotuksesta.



Kuva 10. Tuotteen D analyysien tyypillinen mikrobiologinen kasvusto PCA-alustalla.

Myös tuotteen D näytteitä kasvatettiin spesifisillä antibioottimaljoilla ja viljellyitä pesäkkeitä tarkasteltiin valomikroskoopilla, jolloin voitiin todeta tuotteen sisältävän ainoastaan bakteerikasvustoa.

3.3.2 Hygienianäytteet

Kaikkien hygienianäytteiden kohteet ja tulokset on esitelty Altia Oyj:lle toimitetussa liitteessä 6.

Pintasivelynäytteet ja ATP-mittaukset pullotuslinjastolta

Pintasivelynäytteiden tulosten perusteella pullotuslinjaston kriittiset kohdat olivat mikrobiologiselta laadultaan pääsääntöisesti hyviä. Tällä menetelmällä mikrobiologisen kasvun huomattiin olevan hyvin vähäistä jokaisella käytetyllä kasvatusalustalla. ATP-mittausten tulosten ei myöskään huomattu korreloivan elatusalustoilla muodostuneiden pesäkkeiden määrän kanssa, kun samasta kohteesta otettiin sekä ATP-mittaus, että pintasivelynäyte. ATP-mittausten RLU-arvon huomattiin satunnaisesti olevan yli 10, mikä ei kuitenkaan näkynyt mikrobiologisena kasvuna elatusalustoilla pintaviljelymenetelmällä.

Kontaktiliuskat

Envirocheck®-kontaktiliuskamenetelmällä mikrobiologista kasvua ei havaittu pullotuslinjaston pinnoilta otetuista kohteista.

Laskeumamaljat

Laskeumamaljoilla ei huomattu merkittävää kasvua prosessin aikana otetuista näytteistä. Ilmanlaadun havaittiin olevan mikrobiologisesti lähes yhtä laadukas pullotuskoneen sisällä sekä pullotuslinjaston ympäristössä. Myöskään eri ajankohtina otetuissa näytteissä ei huomattu olevan eroa prosessiympäristön ilmanlaadussa. Keväällä otetut näytteet olivat samankaltaisia (ei huomattavia eroja pesäkkeiden määrän tai morfologian välillä) loppukesästä otettujen näytteiden kanssa. Lisäksi pullotuskoneen sisällä mikrobiologisen ilmanlaadun ei huomattu heikentyvän pullotusprosessin edetessä.

Pullojen huuhteluneste

Pullojen huuhtelunesteessä ei havaittu huomattavaa mikrobiologista kasvua. Tuoreessa huuhtelunesteessä huomattiin hieman enemmän mikrobikasvustoa, kuin muutamaa tuntia vanhemmassa huuhtelunesteessä. Huuhtelunesteen huomattiin myös laimenevan noin 5 prosenttiyksikköä (tilavuus-%) noin kahden vuorokauden aikana, mikä ei kuitenkaan vaikuttanut oleellisesti huuhtelunesteen mikrobiologiseen laatuun. Kuitenkin jo noin viikon vanhassa huuhtelunesteessä huomattiin merkittävää mikrobiologista kasvua jokaisella käytetyllä kasvatusmaljalla. Kasvun havaittiin olevan pääsääntöisesti koko maljan täyttävää hometta.

Tyhjät pullot ja kapselit

Pullotuslinjastolta ennen täyttöä huuhteluun menevät tyhjät pullot todettiin mikrobiologisesti laadultaan puhtaiksi. Myöskään pullojen niin sanottu sliivaus ja kuivaaminen ei suoritettujen testien perusteella aiheuttanut pullojen kontaminoitumista. Pullojen sulkemiseen tarkoitettua korkia ja kapselit todettiin myös puhtaiksi.

Sivelynäytteiden rikastusmenetelmä

Rikastusmenetelmän tuloksista voitiin huomata, että rikastusliemissä tapahtui enemmän samentumista näytteissä, joiden pintasively oli otettu kohteista, joita ei ollut desinfioitu 70 %:lla etanolilla. Tällaiset kohteet pullotuslinjalla olivat desinfioitu käyttämällä ainoastaan desinfektiovaahtoa ja huuhteluvettä. Rikastusliemistä siirrostettiin näytteet kiinteille elatusalustoille, jolloin voitiin tarkastella kasvuston ulkonäköä (kuva 11). Elatusalustoilla havaittiin monenvärisiä ja erilaisia pesäkkeitä riippuen, mistä näyte oli otettu. Samentuneista rikastusliemistä siirrostettujen näytteiden todettiin kasvavan kasvatusmaljoilla paremmin, kuin siirrostusten, joissa samentumaa ei rikastusliemessä aistinvaraisesti havaittu. Rikastuslieminäytteitä kasvatettiin myös antibioottimaljoilla, jolloin voitiin todeta näytteiden sisältävän pääasiassa bakteerikasvustoa.



Kuva 11. Rikastusliemestä siirrostettu näyte MEA-kasvatusalustalle. Moni siirrostus kasvoi kiinteillä elatusalustoilla keltaisina ja vaaleanpunaisina pesäkkeinä.

3.3.3 Kasvatusalustoiden testaus

Jokaista tutkittua tuotetta ja hygienianäytettä kasvatettiin pääsääntöisesti jokaisella elatusalustalla, joita Altia Oyj:n Rajamäen laboratoriossa normaalistikin käytetään mikrobiologisen laadun seurantaan kyseisillä tuotteilla. Uutena kasvatusalustana käytettiin TSA-alustaa, jota testattiin sekä tuotteiden, että hygienianäytteiden mikrobiologisessa analysoinnissa. Tulosten perusteella TSA-maljoilla huomattiin kasvavan monipuolisemmin ulkonäöltään

erilaisia pesäkkeitä pääsääntöisesti jokaisella testatulla tuotteella. Lisäksi seurantanäytteissä TSA-maljojen pesäkemäärä väheni suhteellisesti lähes aina huomattavasti vähemmän, kuin esimerkiksi PCA-maljoilla. TSA-maljoilla kasvua saattoi olla satunnaisesti myös enemmän kuin PCA-maljoilla näytteissä, jotka olivat analysoitu useampi vuorokausi pullotuksen jälkeen. Lisäksi tuotteen B kohdalla TSA-maljoilla kasvua oli lähes aina hieman enemmän kuin PCA-maljoilla. MAA-alustalla ei huomattu ollenkaan mikrobiologista kasvua millään testatulla tuotteella.

Tutkimuksessa käytetyistä antibioottikasvatusalustoista tarkemmat tiedot ovat koottuna liitteessä 1. Antibiootteja testattiin suodattamalla varsinaisia tuotenäytteitä antibioottia sisältävälle maljalle sekä siirrostamalla tunnettua kaupallista mikrobia (hiiva tai bakteeri) spesifisille antibioottikasvatusalustoille. Tulosten perusteella voitiin huomata, että 20 mg/l sykloheksimidiä riitti estämään hiiva- ja homekasvustoa testattujen tuotteiden osalta. NMKL:n menetelmäohjeen mukainen 100 mg/l oksitetrazykliiniä sekä 100 mg/l kloramfenikolia riittivät bakteerikasvuston estämiseen testatuilla maljoilla ja näytteillä.

3.3.4 Mikrobien identifiointi

Molekyylibiologisten töiden näytteet nimettiin näytteiksi 1-4, ja kuvassa on 1 kuvailtu identifiointiin valittujen bakteerien morfologiaa kasvatusalustoilla. Biotekniikan instituutin sekvensointipalvelusta saadut DNA-sekvenssit FASTA-muodossa ovat liitteessä 3. Sekvensointipalvelu käsitti myös sekvenssien tarkistuksen esimerkiksi kontaminaatioiden varalta, joten sekvenssit voitiin linjata suoraan BLAST-ohjelmalla. Kaikkien muiden näytteiden 16S rRNA -sekvenssin pituudeksi saatiin noin 1000 nukleotidia, mutta näytteen 1 osalta 16S rRNA:n pituus jäi noin 500 nukleotidiin. Sekvenssien linjausten tuottamien tulosten 10 merkittävintä vastaavuutta on esitetty liitteessä 4. Tutkittujen näytteiden 16S rRNA -geenisekvenssien samankaltaisuuksiksi saatiin parhaimmillaan 97-98 % tietokannassa olleiden sekvenssien kanssa.

3.3.4.1 Mikrobin identifiointin tulosten tarkastelu

Näyte 1

Sekvensointitulosten perusteella näyte 1 osoittautui *Bacillus*-suvun bakteeriksi. Tuloksista (liite 4) voidaan nähdä, että isolaatti on 97 % todennäköisyydellä *Bacillus subtilis* -bakteeri, mutta myös *B. tequilensis* vastavuus oli 97 %. *B. subtilis* ja *B. tequilensis* 16S rRNA -geenit ovat 99 %:sti identtisiä (Gatson ym. 2006). Tulokset ovat yhdenmukaisia morfologisten havaintojen kanssa, joissa mikrobi osoittautui endosporeja sisältäväksi, sauva- maisiksi, gram-positiiviseksi ja liikkuviksi bakteereiksi. Bakteerit myös levisivät voimakkaasti kasvatusalustoilla, mikä on tyypillistä *B. subtilis* (Fujikawa 1994).

Bacillus-suvun bakteerit ovat tyypillisesti aerobisia, itiöitä muodostavia ja sauvamaisia gram-positiivisia bakteereita. Suvun eniten tutkittu bakteeri on *B. subtilis*, jota käytetään paljon tieteellisissä kokeissa. *B. subtilis* pystyy hapettamaan lukuisia orgaanisia yhdisteitä ja se pystyy kasvamaan hyvin karuissa olosuhteissa. Hapen läsnä ollessa bakteeri käyttää tyypin lähteenä ammoniumioneita sekä glukoosia ja muita sokereita hiilen ja energian lähteenä. Suurin osa *Bacillus*-lajeista on mesofiilisiä ja pesäkkeet ovat hyvin nähtävissä 24 tunnin kasvatuksen jälkeen 37 °C:een lämpötilassa. (Lindsay 2005)

B. subtilis on eristetty monista erilaisista maaperistä, mutta se on kaikkein aktiivisin lähellä maanpintaa, jossa happea on eniten saatavilla. Bakteerissa tapahtuu merkittäviä morfologisia ja fysiologisia muutoksia itiöitymisen seurauksena, jolloin se muodostaa lämmön-, kuivuuden ja säteilyn kestäviä itiöitä (endospore). *Bacillus*-itiöiden on huomattu säilyvän vuosikymmeniä ja ne kestävät pitkiä aikoja ilman ravinteita. *B. subtilis* itiöityminen on hyvin monimutkainen prosessi, jota tapahtuu jatkuvasti, kun ravinteita on niukasti saatavilla. (Lindsay 2005)

Suurin osa *Bacillus*-lajeista kasvaa hyvin kaupallisilla ravintoalustoilla. *B. subtilis* kasvaa helposti hyvin erilaisilla alustoilla ja erilaisissa olosuhteissa, mutta pesäkkeiden morfologia voi vaihdella suuresti riippuen pesäkkeiden iästä ja käytettävästä kasvatusalustasta. *B. subtilis* voi alkaa muodostamaan itiöitä kasvatusalustalla, jos siinä on rajallinen määrä hiiltä, typpeä ja fosforia. Itiöitä muodostuu myös silloin, vaikkakin niukasti, kun vegetatiivisoluja kasvatetaan pitkään alustalla, jossa ravintoaineet lopulta käyvät vähiin. Vaikkakin monet *Bacillus*-lajit (muun muassa *B. alvei*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B.*

macerans ja *B. polymyxa*) kasvavat hapettomissa olosuhteissa, *B. subtilis* on ehdottoman aerobi bakteeri. Mikäli glukoosia ei ole saatavilla, hapettomissa olosuhteissa kasvatetut viljelmät tuhoutuvat autolyysin seurauksena. (Harwood ja Cutting 1990)

B. subtilis voi aiheuttaa leivän ja muiden leipomotuotteiden pilaantumista vaikuttamalla tuotteen hajuominaisuuksiin ja pehmentämällä leivän rakennetta. Pilaantuneen tuotteen nauttiminen voi lisäksi johtaa *B. subtiliksen* toksisiin aiheuttamaan ruokamyrkytykseen. Pilaantunut leipä saattaa aiheuttaa sairauksia, kun bakteerin määrä tuotteessa on vähintään 10^8 pmy/g (Valerio ym. 2008). *B. subtilista* löydetään harvoin ruokamyrkytyksiin liittyvissä tapauksissa, eikä bakteerin roolia myrkytystapauksissa tunneta kovin hyvin. Sen sijaan joidenkin *B. subtilis* -kantojen tuottama Toksiini tunnetaan hyvin, joten sen merkitys myrkytystapauksissa on selvempi. (Logan 2011.) Bakteerin enterotoksiinin tuotannon on huomattu olevan mahdollista, kun kasvualusta on sisältänyt glukoosia tai maltodekstriiniä (Rowan ym. 2001). *B. subtilista* ei kuitenkaan pidetä patogeeninä ihmiselle ja se on Euroopan Elintarviketurvallisuusviranomaisen (EFSA) elintarviketurvallisiksi oletettujen mikrobien QPS-listalla (Qualified presumption of safety). *B. subtilis* -bakteerikantoja esiintyy lähinnä maitotuotteissa ja näissä mikrobipitoisuuden on oltava vähintään 10^7 pmy/ml, jotta merkittäviä määriä Toksiinia voi muodostua (Griffiths 1990). Useat *B. subtilis* -bakteerikannat myös inhiboivat patogeenisten bakteerien kasvua (Barbosa ym. 2005).

Bacillus-soluille ominaista on niiden kyky muodostaa biofilmiä kiinteille pinnoille, kuten säiliöihin ja prosessilinjoihin, joita ei ole helppo pitää puhtaana (Soni 2016). *B. subtiliksen* muodostama biofilmi on tärkeä kontaminantti varsinkin meijeri- ja leipomoteollisuudessa (Lindsay 2005). *B. subtilis* muodostaa biofilmiä usein itiönmuodostuksen yhteydessä ja nopea itiönmuodostuskyky korreloi suoraan biofilmin muodostuksen kanssa (Hong ym. 2009). Jotkin tutkimukset ovat osoittaneet, että *B. subtiliksen* muodostamasta biofilmistä 0,1 % on itiöitä. Elintarviketeollisuudessa itiöitä sisältävää biofilmiä muodostuu tuotantolaitteiden pinnoille varsinkin silloin, kun laitteiston pesuvälit venyvät pitkiksi (Lindsay 2005).

Näyte 2

Sekvensointitulosten perusteella näyte 2 osoittautui myös *Bacillus*-suvun bakteeriksi. Tuloksista (liite 4) voidaan huomata, että useampi kanta oli vastaavuudeltaan vähintään 97 %. Kaksi kantaa (*Bacillus velezensis* strain FZB42 ja *Bacillus vallismortis* strain DSM 11031) olivat kuitenkin 98 %:sti identtisiä 16S rRNA -geenisekvensseiltään.

*B. velezensis*in fylogeneettisen puun topologian ja 16S rRNA -geenisekvensoinnin perusteella on huomattu, että bakteeri kuuluu *B. subtilis* -mikrobiryhmään. *B. velezensis*in kantojen 16S rRNA -geenisekvensointi tuotti 99 % samankaltaisuuden *B. subtilis*in alalajien (*B. amyloliquefaciens*, *B. vallismortis*) kanssa. Bakterin genomiikka ja fenotyyppiset tutkimukset osoittavat, että *B. velezensis* on kokonaan uusi laji *Bacillus*-suvussa (Wang ym. 2008).

B. velezensis eristettiin ensimmäistä kertaa Vélez-nimisestä joesta Etelä-Espanjassa, mistä bakteeri on myös saanut nimensä (Ruiz-Garcia ym. 2005). *B. velezensis* on sauvamainen, gram-positiivinen bakteeri. Se esiintyy yleensä yksittäin tai parittain, mutta toisinaan myös lyhyissä ketjuissa. Endosporet esiintyvät soikeina itiöpesäkkeissä. TSA-kasvatusalustalla *B. velezensis* kasvaa kermanvaaleina, karheina ja epätasaisina pesäkkeinä. Bakteeri kasvaa 15-45 °C:een lämpötilassa pH-arvon ollessa 5-10. *B. velezensis* on katalaasi- ja oksidaasipositiivinen ja se käyttää happea kasvuunsa, eikä kasva anaerobisesti. Bakteeri on herkkä antibiooteille ja esimerkiksi 30 mg/l kloramfenikolipitoisuus riittää estämään bakteerin kasvun (Ruiz-Garcia ym. 2005). *B. velezensis*in kanta BAC03 on erilaisten kasvien kasvua edistävä maabakteeri, jolla on esimerkiksi antimikrobisia vaikutuksia muihin kilpaileviin maabakteereihin (Meng ym. 2016).

Näyte 3

Näytteen 3 sekvensointitulosten perusteella näyte osoittautui *Paenibacillus*-suvun bakteeriksi. Tuloksista (liite 4) voidaan nähdä, että kaksi *Paenibacillus humicus* -kantaa olivat identtisyydeltään 97 %. Muiden kantojen samankaltaisuus oli alle 97 %, joten näillä ei oleteta olevan suurta biologista merkitystä.

Paenibacillus-suvun bakteerit ovat fakultatiivisesti anaerobeja, endosporeja muodostavia bakteereja. *Paenibacillus*-bakteereja tavataan tyypillisesti maaperässä, vesistöissä ja kasveissa. *P. humicus* -bakteerit ovat sauvamaisia, katalaasi- ja oksidaasipositivisia sekä gram-negatiivisia bakteereja, jotka voivat liikkua uintisiimojensa avulla. Bakteerit voivat muodostaa itiöitä turvonneessa itiöpesäkkeessä (sporangia), ja suotuisissa olosuhteissa itiöt itävät ja niistä kehittyy parveiluitiöitä (swarming cells). *P. humicus* ei kasva hapettomissa olosuhteissa, 45 °C:een lämpötilassa, eikä 5 % NaCl-pitoisuudessa. (Vaz-Moreira 2007)

P. humicus on eristetty pilaantuneesta oluesta. Bakteerin huomattiin muodostavan 20 vuorokaudessa nähtävää oluen samentumista. *P. humicuksen* ominaisuuksia ei kuitenkaan tunneta vielä kovin hyvin, eikä sitä ole aiemmin pidetty olutta pilaavana bakteerina. (Haakensen & Ziola 2008.) Itiöitä muodostavien bakteerien esiintymistä ja diversiteettiä on tutkittu erilaisissa oluissa. Munfordin ym. (2017) tutkimuksessa *P. humicuksen* huomattiin esiintyvän esimerkiksi lager- ja aletyyppisissä oluissa sekä alkoholittomissa oluissa. *P. humicus* on lisäksi eristetty pilaantuneesta kuivattuja yrttejä sisältävästä lisäravinteesta, mutta bakteerin roolia lisäravinteen pilaajana ei tunneta (Rossi ym. 2010).

Näyte 4

Näytteen 4 sekvensointitulosten perusteella isolaatti osoittautui *Sphingomonas*-suvun bakteeriksi (liite 4). Tuloksista voidaan nähdä, että usean kannan samankaltaisuus oli 97 %. *Sphingomonas paucimobiliksen* kanta ATCC 29837 oli kuitenkin 98 %:sti identtinen 16S rRNA -geenisekvenssiltään.

S. paucimobilis on sauvamainen, gram-negatiivinen ja ehdottoman aerobi bakteeri. Se on katalaasipositiivinen ja heikosti oksidaasipositiivinen, ja kasvatusalustoilla ne muodostavat kellertäviä pesäkkeitä. Bakteerilla on yksittäinen flagelli, mutta solut eivät kuitenkaan ole aktiivisesti liikkuvia. *S. paucimobilis* esiintyy laajasti maaperässä ja vesistöissä sekä sitä on eristetty sairaalaympäristöistä (Steinberg ym. 2015). Koskisen ym. (2000) tutkimuksessa *S. paucimobilis* eristettiin juomavedestä Suomessa ja Ruotsissa. Suuri osa isolaateista kasvoi 5 °C:een lämpötilassa ja ne pystyivät muodostamaan biofilmiä vesiputkistoissa.

Sphingomonas-suku käsittää ainakin 12 lajia, joista ainoastaan *S. paucimobilista* pidetään ajoittain ihmiselle patogeeninä. Bakteeri on opportunistisen patogeeni ja se voi aiheuttaa infektion, mikäli ihmisellä on esimerkiksi heikentynyt immuunipuolustus. (Steinberg ym. 2015)

4 POHDINTA

Työn tarkoituksena oli tutkia R1-pullotuslinjan prosessihygieniaa ja tulosten pohjalta kehittää hygienian toimintatapoja. Tuloksia pyrittiin vertaamaan juomateollisuuteen liittyviin tutkimuksiin ja muuhun kirjallisuuteen. Altia Oyj:n Rajamäen tehtaan alkoholittomat ja matala-alkoholiset vesi-, mehu- ja viinipohjaiset tuotteet eroavat kuitenkin merkittävästi esimerkiksi panimoiden olut- ja siiderityyppisistä tuotteista, jotka tyypillisesti valmistetaan käymismenetelmällä, ja joiden tuotannosta on paljon mikrobiologisia tutkimuksia.

Tuotteet

Tuotteiden mikrobiologisessa laadussa huomattiin säännöllisesti paljon vaihtelua varsinkin tuotteiden A ja B osalta. Laatuun saattoi vaikuttaa pullotuksesta kulunut aika, jolloin mikrobiologiset analyysit suoritettiin. Analyysit pyrittiin suorittamaan välittömästi pullotuksen jälkeen ja enintään noin tunnin kuluttua pullotuksesta. Satunnaisesti analyysi saatettiin suorittaa kuitenkin vasta noin 3-6 tunnin kuluttua tai seuraavana päivänä pullotuksesta, mikä todennäköisesti vaikutti mikrobien eloonjäämiseen tuotteissa. Tulosten perusteella voitiin nähdä, että mikrobiologinen kasvu väheni merkittävästi ensimmäisten vuorokausien aikana, ja noin 10 vuorokauden kuluttua kasvua ei pääsääntöisesti enää havaittu tuotteiden A ja B kohdalla. Tuotteen B alhainen pH todennäköisesti myös lisäsi oleellisesti mikrobien kuolemisenopeutta. Juomien happamuuden ($\text{pH} < 4,6$) on tutkittu olleen tärkein mikrobien kasvua rajoittava tekijä panimoteollisuuden tuotteissa (Menz ym. 2010). Tuotteesta A eristetyn ja *Paenibacillus*-suvun bakteeriksi tunnistetun mikrobien oletettiin esiintyvän tuotteessa satunnaisesti ja morfologisten havaintojen perusteella kyseisen bakteerin huomattiin esiintyvän pullotetussa tuotteessa vähintään yhden kuukauden ajan. Seurantanäytteissä havaittiin kasvua kuitenkin vain todella harvoin yli 10 vuorokauden jälkeen ja uusintanäytteissä tuote oli aina puhdas, joten kasvun voitiin olettaa olevan pullokohtaista. Lisäksi tehtaan laboratoriossa voitiin tarkastella ainoastaan mikrobien morfologiaa, joten tuotteessa esiintyvät mikrobit voivat olla muitakin, kuin *Paenibacillus*-suvun bakteereja. Toisen tuotteesta A eristetyn ja *Sphingomonas*-suvun bakteeriksi tunnistetun mikrobien oletettiin kuolevan pullotetussa tuotteessa viimeistään 10 vuorokauden kuluttua pullotuksesta. Esimerkiksi PCA-, TSA- ja MEA-alustalla keltaisena pesäkkeenä kasvavan bakteerin ei huomattu milloinkaan kasvavan yli 10 vuorokauden jälkeen otetuissa seurantanäytteissä. *Sphingomonas*-suvun bakteerien tiedetään olevan ehdottoman aerobeja bakteereja (Balkwill ym. 2003), joten näiden voidaankin olettaa kuolevan pullotetussa tuotteessa.

Tuotteen C mikrobiologisissa analyyseissä havaittiin hieman eroa kahden eri tuotantoerän välillä, mihin saattoi vaikuttaa tuotantoerien erilaiset pastörintilämpötilat. Ensimmäisen erän pastörintilämpötila oli 62 °C:tta, jolloin elatusalustoilla havaittiin hieman enemmän mikrobiologista kasvua, kuin toisen erän analyyseissä, jolloin pastörintilämpötilaksi nostettiin 72 °C:tta. Tuotteen C raaka-aineista 67 S -nestesokerissa ja rypälemehutiivisteessä huomattiin harvoin yksittäisiä ulkonäöltään samanlaisia pesäkkeitä ja kasvustoa, kuin valmiissa pulloitetussa tuotteessa. Tuotteesta eristetyt ja *Bacillus*-suvun bakteereiksi tunnistetut mikrobit ovat itiöitä muodostavia bakteereja, joiden on todettu germinoituvan vegetatiivisoluiksi pastörintilämpötiloissa maidon prosessoinnissa (Hanson ym. 2005). Ilmiö voisi siten selittää sen, että tuotteen C raaka-aineiden mikrobiologisissa analyyseissä ei havaittu samanlaista nopeasti leviävää kasvustoa, kuin valmiissa pastöroidussa tuotteessa.

Hygienianäytteet

R1-pullotuslinjalta kerätyt hygienianäytteet olivat mikrobiologiselta laadultaan pääsääntöisesti hyviä käytetyllä pintasivelymenetelmällä. Satunnaisesti huomattiin paljonkin kasvua esimerkiksi täyttöpillistä otetusta näytteestä, mutta kasvu saattoi johtua myös esimerkiksi valun aikana kontaminoituneesta kasvatusmaljasta. Analyyseissä ei käytetty myöskään rinnakkaisia näytteitä, jotka olisivat tuoneet enemmän luotettavuutta tuloksiin. ATP-mittausten tulokset olivat ajoittain varsin suuria, mikä ei kuitenkaan näkynyt mikrobiologisena kasvuna elatusalustoilla. Tulokset ovat yhdenmukaisia esimerkiksi Pouliksen ym. (1993) tutkimuksen kanssa, jossa elintarviketeollisuuden prosessointipinnoilta kerättyjen pintasivelynäytteiden tulokset eivät korreloineet ATP-mittausten kanssa. Pintasivelynäytteitä otettiin myös prosessin aikana, jolloin aistinvaraisesti huomattiin esimerkiksi täyttöpillien likaantumista, mutta elatusalustoilla ei tällöinkään huomattu pesäkkeiden muodostusta. Lisäksi laskeumamaljojen ja pullojen huuhtelunesteen huomattiin olevan varsin puhtaita. Huuhtelunesteen mikrobiologisen kasvun huomattiin vähenevän prosessin edetessä, joten mikrobien voitiin olettaa olevan peräisin huuhtelunesteen raaka-aineista sen valmistusvaiheessa.

Pintasivelynäytteiden laimennokset tehtiin pääasiassa steriiliin veteen laboratorion käytöjen mukaisesti. Työssä testattiin myös fysiologisen suolaliuoksen ja NaCl-peptoniliuoksen käyttöä näytteiden laimentamisessa. Menetelmien välillä ei kuitenkaan huomattu merkittäviä eroja elatusalustoille muodostuneiden pesäkkeiden määrissä. Menetelmät vaatisivat

kuitenkin lisää testausta, koska jokaista pintasivelynäytettä ei aina voitu testata käyttämällä jokaista liuosta, jolloin olisi voitu olla varmempia menetelmien toimivuudesta.

Tuotteen A suodatusnäytteissä huomattiin usein enemmän mikrobiologista kasvua pullotusprosessin myöhemmässä vaiheessa, kuin alussa. Tästä voitiin siten päätellä, että prosessin aikana tapahtuisi kuitenkin laitteiden tai materiaalien likaantumista. Kun pullotuslinjan huuhtelu- ja täyttöpillit desinfioitiin 70 %:lla etanolilla tunnin välein, tuotteiden suodatusnäytteissä havaittiin hyvin vähän mikrobiologista kasvua. Henrikssonin ja Haikaran (1992) tutkimuksessa todettiin prosessin aikaisen desinfioinnin vähentävän merkittävästi oluen pilaajamikrobeja, joten tulosta voitaisiin pitää yhdenmukaisena tutkimuksen kanssa. Lisäksi laskeumamaljoilla ei huomattu kasvua ollenkaan, kun laitteisto desinfioitiin tunnin välein.

Pintasivelynäytteitä päätettiin kasvattaa rikastusliemissä, koska varsinaisilla elatusalustoilla ei pääsääntöisesti huomattu kasvua. Haluttiin kuitenkin tietää, onko pullotuslinjan pinnoilla mahdollisia tuotteiden kontaminaatioita aiheuttavia mikrobeja. Rikastusliemistä siirrostettiin näytteitä kasvatusmaljoille, jolloin voitiin huomata, että näytteet sisälsivät pääasiassa ulkonäöltään samankaltaisia pesäkkeitä, kuin esimerkiksi tuotteet A ja B. Rikastusnäytteissä oli kasvua vain harvoin, kun näyte oli kerätty kohteesta, joka oli desinfioitu 70 %:lla etanolilla. Kuitenkin ainoastaan desinfiointivaahdolla desinfioidusta kohteesta löydettiin aina pääsääntöisesti bakteereja, mutta satunnaisesti myös hiivakasvustoa.

Tuotteen C raaka-aineissa havaittiin paljon erilaista mikrobiologista kasvua, joka tyypillisesti kuitenkin poikkesi ulkonäöltään pullotettujen tuotteiden mikrobiologisista analyyseistä. Nestesokerissa havaittiin kuitenkin ulkonäöltään samankaltaisia keltaisia pesäkkeitä, kuten tuotteissa A ja B. Näytteenotto raaka-aineiden osalta tapahtui kuitenkin pääsääntöisesti varastointitankkien näytteenottohanoista, joita oli hyvin vaikea pestä ja desinfioda ennen näytteenottoa. Tuloksia ei siten voida pitää täysin luotettavina, mutta voitiin kuitenkin päätellä, että raaka-aineet tai näiden varastointitankit voisivat olla tällaisten mikrobien lähteenä. Mikrobien ulkonäön perusteella kasvusto voisi olla tunnistettua *Sphingomonas*-suvun bakteeria, jonka on todettu pystyvän muodostamaan myös biofilmiä (Gusman ym. 2012). Tuotteessa D havaittiin lisäksi samanlaista kasvua, kuin tuotteessa C. Tuotteissa käytetään osittain samoja raaka-aineita, mikä voisi selittää sen, että tuotteiden mikrobit ovat peräisin käytettävistä raaka-aineista.

Elatusalustat

TSA-kasvatusalustalla huomattiin kasvavan monipuolisemmin erilaisia pesäkkeitä muodostavia mikrobeja, kuin esimerkiksi PCA- tai MEA-alustoilla. TSA-alustalla huomattiin lisäksi usein PCA- ja MEA- alustoja enemmän kasvustoa tuotteen B happamissa olosuhteissa sekä seurantanäytteissä, jotka olivat analysoitu useampi vuorokausi pullotuksen jälkeen. TSA on PC- ja ME-agareita ravinnerikkaampi, joten esimerkiksi stressaantuneiden solujen voidaan olettaa kasvavan paremmin TSA:lla. Mikrobiologisissa analyyseissä usein esiintyneet keltaiset pesäkkeet kasvoivat määrällisesti parhaiten PCA-alustalla +30 °:ssa. MEA-alustoilla huomattiin yleensä samankaltaisia, mutta läpimitaltaan paljon pienempiä keltaisia pesäkkeitä, kuin PCA-alustalla. MEA-alustoja inkuboitiin huoneenlämmössä, joka voisi selittää pesäkkeiden hitaamman kasvun.

NMKL:n menetelmäohjeiden mukaiset 100 mg/l oksitetrazykliiniä sekä 100 mg/l kloramfenikolia käytetyillä alustoilla riittivät bakteerikasvuston estämiseen testatuilla tuotteilla. Hiivojen kasvun estämiseen tarkoitettua sykloheksimidiä pyrittiin lisäämään mahdollisimman pieni määrä, ja 20 mg/l pitoisuus huomattiin riittäväksi testatuilla tuotteilla. Oksitetrazykliiniä lisättiin OGYE-agarille ja kloramfenikolia sekä sykloheksimidiä testattiin PC- ja TS-agareilla. Antibioottien testausta rajoittivat kuitenkin resurssit ja käytettävissä ollut aika, ja esimerkiksi sykloheksimidiä olisi voinut testata useammissa pitoisuuksissa ja erilaisilla hiivakannoilla. Testattu kaupallinen *Saccharomyces cerevisiae* -kanta ei kasvanut käytetyllä alustalla 20 mg/l pitoisuudessa, mutta tämän työn tutkituissa tuotteissa todettiin olevan hyvin vähän hiivoja ja homeita, joten pitoisuuden riittävydestä ei voida olla kovinkaan varmoja.

Mikrobien identifiointi

Kaikkien neljän bakteerinäytteen suku onnistuttiin tunnistamaan 16S rDNA -menetelmällä. Bakteerien morfologiaa tarkastelemalla pyrittiin saamaan vielä tarkempia lajimäärityksiä tutkielman kohdan 3.3.4.1 mukaisesti. Läheisesti toisilleen sukua olevilla bakteereilla on kuitenkin myös samanlaisia morfologisia ominaisuuksia, joten varmaa lajimääritystä ei näillä menetelmillä voitu saavuttaa. Tarkkaa lajimääritystä varten tarvittaisiin lisätutkimuksia esimerkiksi DNA-DNA-hybridisaatio-menetelmällä, jolloin myös esimerkiksi identtisen 16S rRNA-geenisekvenssin omaavat *Bacillus*-lajit voitaisiin erottaa toisistaan (Janda & Abbott 2007).

Tunnistettujen bakteerien todettiin esiintyvän pääasiassa maaperässä, joten tuotteissa esiintyessään bakteerit saattoivat olla peräisin esimerkiksi käytetyistä raaka-aineista tai näiden varastointitankeista. Laitteissa esiintyessään bakteerit ovat lisäksi voineet päästä tehdastiloihin esimerkiksi ihmisvälitteisesti tuotannon ulkopuolelta. Kirjallisuuden perusteella *Bacillus*-solujen ja *S. paucimobiliksen* on todettu voivan muodostaa biofilmiä esimerkiksi putkistoihin, mikä myös voisi selittää näiden bakteerien runsaan esiintymisen tuotteissa. Tuotteesta A eristetty ja tunnistettu *Paenibacillus*-suvun bakteeri todettiin kirjallisuuden perusteella fakultatiivisesti anaerobiksi ja itiöiväksi bakteeriksi. Tuotteen A seurantanäytteessä huomattiin kuukauden jälkeen morfologialtaan samanlaista kasvustoa, kuin tunnistettu *Paenibacillus*-bakteeri, joten sen voidaankin olettaa säilyvän pullotetussa tuotteessa.

5 PÄÄTELMÄT

Työssä saatujen tulosten perusteella R1-pullotuslinjan prosessihygienia on riittävällä tasolla, mikäli nykyisiä matala-alkoholisten ja alkoholittomien tuotteiden pullotusprosessin hygieniakäytäntöjä noudatetaan. Tutkimuksessa käytetyillä analyysimenetelmillä tuotteissa ei havaittu alkoholijuomia tyypillisesti pilaavaa hiivakasvustoa. Tuotteiden tyyppien takia olosuhteet eivät myöskään ole otollisia pilaajamikrobien merkittävälle kasvulle. Tutkimuksen alussa prosessin hygieniakäytäntöjä oli vasta muutettu, jolloin tuotteissa havaittiinkin enemmän mikrobiologista kasvua. Runsas kasvu näkyi myös seurantanäytteissä viikkojen jälkeen pullotuksesta, mikä saattaisi vaikuttaa esimerkiksi tuotteen aromiin. Pullotuslinjalta otetuissa hygienianäytteissä ei havaittu merkittävää kasvua, mutta esimerkiksi pullotuslaitteiston desinfioinnin tunnin välein huomattiin vaikuttavan tuotteissa esiintyvien mikrobien määrään niitä vähentävästi. Tyypillisesti mikrobit kuitenkin kuolivat noin 10 vuorokauden aikana pullotuksesta tutkittujen matala-alkoholisten tuotteiden osalta.

Työn kahdessa tutkitussa tuotteessa havaittiin itiöitä muodostavia bakteereja, joita ei kuitenkaan huomattu esimerkiksi pullotusprosessin hygienianäytteissä. Bakteerien voitiinkin siten olettaa olevan peräisin tuotteiden raaka-aineista tai tuotteiden valmistukseen käytettävistä laitteista ja putkistoista ennen varsinaista pullotusprosessia. Pastöroinnin voitiin lisäksi olettaa herättävän itiöt vegetatiivisoluiksi, koska esimerkiksi samanlaista pesäkkeenmuodostusta ei havaittu tutkituissa raaka-aineissa. Tieteellisistä tutkimuksista ei kuitenkaan löytynyt tietoa työssä tunnistettujen bakteerien mahdollisista vesi- ja mehutyypisiä alkoholijuomia pilaavista ominaisuuksista. Tuotteiden pitkä säilyvyysaika on kuitenkin syytä ottaa

huomioon, koska tuotteessa esiintyvä runsas mikrobipitoisuus saattaa esimerkiksi vaikuttaa tuotteen maku- ja hajuominaisuuksiin.

Tutkimuksen mikrobiologisissa analyyseissä mikrobeja kasvatettiin ainoastaan hapen läsnä ollessa, mutta esimerkiksi pulloitetujen tuotteiden osalta myös anaerobinen viljely eri kasvatusalustoja käyttäen voisi olla kannattavaa. Lisäksi antibioottien testaaminen eri pitoisuuksissa vaatisi lisää tutkimusta, koska varsinkin sykloheksimidin osalta pitoisuuden riittävydestä ei voitu olla varmoja. Työssä testatuista uusista kasvatusalustoista MAA-alustaa voisi testata esimerkiksi joidenkin viinien mikrobiologisissa analyyseissä säilöntäaineresistenttien hiivojen varalta. Tutkimuksen aikana hygienianäytteitä otettiin melko kattavasti pulloituslinjalta, mutta esimerkiksi pastörintilaitteesta ja säiliöiden sisäpinnoilta näytteitä ei saatu otettua menetelmän epäkäytännöllisyyden vuoksi. Tällaiset vaikeasti puhtaana pidettävät paikat saattaisivat olla otollisia biofilmin muodostumiselle.

LÄHDELUETTELO

- [EFSA] European Food Safety Authority. *Microbiological criteria*. Saatavilla: https://ec.europa.eu/food/safety/biosafety/food_hygiene/microbiological_criteria_en (Haettu 16.8.2018).
- [ICMSF] International Commission on Microbiological Specifications for Foods Staff. 1998, *Micro-Organisms in Foods: Microbial Ecology of Food Commodities*, 1. p. Springer US, s. 418-468.
- [NMKL] Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea. *Menetelmäohje N:o 5/2001*. 2001. Saatavilla: <http://www.nmkl.org/dokumenter/fi/5fi.pdf> (Haettu 10.5.2018).
- [NMKL] Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea. *Menetelmäohje N:o 98/2005*. 2005. Saatavilla: <http://www.nmkl.org/dokumenter/fi/98fi4utg.pdf> (Haettu 13.5.2018).
- Agle, M.E. 2007, Biofilms in the food industry, teoksessa: *Biofilms in the food environment*, 1. p. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, s. 3-18.
- Ahvenainen, R. 1988, Quality assurance and quality control of aseptic packaging, *Food Reviews International*, 4(1), s. 45-76.
- Balkwill, D.L. 2003, *Sphingomonas and Related Genera*. teoksessa: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. 3. p. New York, New York: Springer-Verlag, s. 605-629.
- Bartowsky, E.J. & Henschke, P.A. 2008, Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—a review, *International journal of food microbiology*, 125(1), s. 60-70.
- Codex Alimentarius Commission 2003, *RECOMMENDED INTERNATIONAL CODE OF PRACTICE GENERAL PRINCIPLES OF FOOD HYGIENE CAC/RCP 1-1969*. Saatavilla: <https://www.mhlw.go.jp/english/topics/importedfoods/guideline/dl/04.pdf> (Haettu 5.9.2018).
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. & Böttger, E.C. 1989, Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA, *Nucleic acids research*, 17(19), s. 7843-7853.
- Entis, P. 2002, *Food Microbiology: The Laboratory*, Washington, DC: Food Processors Institute, s. 34
- Euroopan komissio. 2005, *Asetus (EY) N:o 2073/2005*. Saatavilla: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:FI:PDF> (Haettu 16.8.2018).
- Euroopan komissio. 2004, *Euroopan parlamentin ja neuvoston asetukset (EY) N:o 852/2004*. Saatavilla: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0003:0021:FI:PDF> (Haettu 18.8.2018).

- Euroopan neuvosto. 1998. *Direktiivi 98/83/EY*. Saatavilla: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/?uri=LEGISSUM%3A128079> (Haettu 16.8.2018).
- Evira 2017, *Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaatimukset, komission asetuksen (EY) No 2073/2005 soveltaminen*. Saatavilla: <https://www.evira.fi/tietoa-evirasta/julkaisut/elintarvikkeet/oppaat/elintarvikkeiden-mikrobiologiset-vaatimukset-komission-asetuksen-ey-no-20732005-soveltaminen/> (Haettu 7.9.2018).
- Evira, 2018a. *Elintarvikelainsäädäntö*. Saatavilla: <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/valmistus-ja-myynti/lainsaadanto/> (Haettu 12.8.2018).
- Evira, 2018b. *Omavalvonta*. Saatavilla: <https://www.evira.fi/yhteiset/omavalvonta> (Haettu 16.8.2018).
- Evira, 2018c. *Elintarvikehygienia*. Saatavilla: <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/valmistus-ja-myynti/elintarvikehygienia/> (Haettu 20.8.2018).
- Evira, 2018d. *Mikrobikriteeriasetus*. Saatavilla: <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/valmistus-ja-myynti/valvonta/omavalvonta/mikrobiologinen-turvallisuus/mikrobikriteeriasetus/> (Haettu 5.9.2018).
- Evira, 2018f. *Elintarvikkeiden mikrobiologinen näytteenotto ja analyysit*. Saatavilla: https://www.evira.fi/globalassets/tietoa-evirasta/julkaisut/oppaat/mikrob_vaatimukset/eviran_ohje_10501_2.pdf (Haettu 6.9.2018).
- Fujikawa, H. 1994, Diversity of the growth patterns of *Bacillus subtilis* colonies on agar plates, *FEMS microbiology ecology*, **13**(3), s. 159-167.
- Gatson, J.W., Benz, B.F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K. & Hart, M.E. 2006, *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**(7), s. 1475-1484.
- Griffiths, M.W. 1990, Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk, *Journal of food protection*, **53**(9), s. 790-792.
- Gusman, V., Medic, D., Jelesic, Z. & Mihajlovic-Ukropina, M. 2012, *Sphingomonas paucimobilis* as a biofilm producer, *Arch Biol Sci*, **64**(4), s. 1327-1332.
- Haakensen, M. & Ziola, B. 2008, Identification of novel *horA*-harbouring bacteria capable of spoiling beer, *Canadian journal of microbiology*, **54**(4), s. 321-325.
- Hanson, M.L., Wendorff, W.L. & Houck, K.B. 2005, Effect of heat treatment of milk on activation of *Bacillus* spores, *Journal of food protection*, **68**(7), s. 1484-1486.
- Harris, K.L., Bobe, G. & Bourquin, L.D. 2009, Patulin surveillance in apple cider and juice marketed in Michigan, *Journal of food protection*, **72**(6), s. 1255-1261.
- Harwood, Colin R., Cutting, Simon M., 1990, *Molecular biological methods for Bacillus*, Wiley, Chichester; New York, s. 2-8.

- Henriksson, E. & Haikara, A. 1991, Airborne microorganisms in the brewery filling area and their effect on microbiological stability of beer, *Monatsschrift fuer Brauwissenschaft (Germany, FR)*.
- Hong, H.A., Khaneja, R., Tam, N.M., Cazzato, A., Tan, S., Urdaci, M., Brisson, A., Gasbarrini, A., Barnes, I. & Cutting, S.M. 2009, *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract, *Research in microbiology*, **160**(2), s. 134-143.
- Ingram, L.O. 1989, Ethanol tolerance in bacteria, *Critical reviews in biotechnology*, **9**(4), s. 305-319.
- Janda, J.M. & Abbott, S.L. 2007, 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls, *Journal of clinical microbiology*, **45**(9), s. 2761-2764.
- Jatila, H. 2018. *Puhelinkeskustelu*. 28.11.2018.
- Juvonen, R., Virkajärvi, V., Priha, O. & Laitila, A. 2011, Microbiological spoilage and safety risks in non-beer beverages, *VTT Tiedotteita-Research Notes*, **2599**.
- Kilcast, D. & Subramaniam, P. 2011, *Food and beverage stability and shelf life*, Elsevier.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. & Glöckner, F.O. 2013, Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, *Nucleic acids research*, **41**(1), s. e1.
- Korkeala, H. 2007, *Elintarvikehygienia - ympäristöhygienia, elintarvike- ja ympäristötoksikologia*, 1. p., WSOY, s. 176, 226-227, 260-261, 385-386, 393-394, 402.
- Koskinen, R., Ali-Vehmas, T., Kämpfer, P., Laurikkala, M., Tsitko, I., Kostyal, E., Atroshi, F. & Salkinoja-Salonen, M. 2000, Characterization of *Sphingomonas* isolates from Finnish and Swedish drinking water distribution systems, *Journal of applied microbiology*, **89**(4), s. 687-696.
- Kregiel, D. 2015, Health safety of soft drinks: contents, containers, and microorganisms, *BioMed research international*, **2015**.
- Lawlor, K.A., Schuman, J.D., Simpson, P.G. & Taormina, P.J. 2009, Microbiological spoilage of beverages, teoksessa *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*, Springer, s. 245-284.
- Lindsay, D., Brözel, V.S. & Von Holy, A. 2005, Spore formation in *Bacillus subtilis* biofilms, *Journal of food protection*, **68**(4), s. 860-865.
- Liu, L., Zhang, B., Tong, H. & Dong, X. 2006, *Pediococcus ethanolidurans* sp. nov., isolated from the walls of a distilled-spirit-fermenting cellar, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**(10), s. 2405-2408.
- Logan, N.A. 2012, *Bacillus* and relatives in foodborne illness, *Journal of applied microbiology*, **112**(3), s. 417-429. DOI 10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x.

- Maa- ja metsätalousministeriö. 2006. *Elintarvikelaki 13.1.2006/23*. Saatavilla: <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2006/20060023> (Haettu 12.8.2018).
- Maa- ja metsätalousministeriö. 2011. *Asetus ilmoitettujen elintarvikehuoneistojen elintarvikehygieniasta 20.12.2011/1367*. Saatavilla: <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2011/20111367> (Haettu 20.8.2018).
- Maa- ja metsätalousministeriö. 2018, *Elintarvikkeita koskeva lainsäädäntö*. Saatavilla: <https://mmm.fi/lainsaadanto/elaimet-elintarvikkeet-ja-terveys/lainsaadanto/l-rekisteri> (Haettu 12.8.2018).
- Macrae, A. 2000, The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology, *Brazilian Journal of Microbiology*, **31**(2), s. 77-82.
- Madden, T. 2013, *The BLAST Sequence Analysis Tool. The NCBI Handbook*. Saatavilla: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK153387/>. (Haettu 22.11.2018)
- Meng, Q., Jiang, H. & Hao, J.J. 2016, Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth, *Biological control*, **98**, s. 18-26.
- Menz, G., Vriesekoop, F., Zarei, M., Zhu, B. & Aldred, P. 2010, The growth and survival of food-borne pathogens in sweet and fermenting brewers' wort, *International journal of food microbiology*, **140**(1), s. 19-25.
- Munford, A.R., Alvarenga, V.O., do Prado-Silva, L., Crucello, A., Campagnollo, F.B., Chaves, R.D., Oteiza, J.M. & Sant'Ana, A.S. 2017, Sporeforming bacteria in beer: Occurrence, diversity, presence of hop resistance genes and fate in alcohol-free and lager beers, *Food control*, **81**, s. 126-136.
- Murdock, D.I., Troy, V.S. & Folinazzo, J.F. 1953, THERMAL RESISTANCE OF LACTIC ACID BACTERIA AND YEAST IN ORANGE JUICE AND CONCENTRATE, *Journal of Food Science*, **18**(1-6), s. 85-89.
- Muziasari, W. 2018. *Sähköpostiviesti. 7.11.2018*
- Nguyen, N., Warnow, T., Pop, M. & White, B. 2016, A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity, *NPJ biofilms and microbiomes*, **2**, s. 16004.
- Onkamo, P. 2015. *Bioinformatiikan luentomateriaali*. Helsingin yliopisto. 2015.
- Orth, R. 1998, The importance of disinfection for the hygiene in the dairy and beverage production, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **41**(3-4), s. 201-208.
- Pistelok, F., Pohl, A., Stuczyński, T. & Wiera, B. 2016, Using ATP tests for assessment of hygiene risks, *Ecological Chemistry and Engineering S*, **23**(2), s. 259-270.
- Poulis, J.A., De Pijper, M., Mossel, D. & Dekkers, P.P.A. 1993, Assessment of cleaning and disinfection in the food industry with the rapid ATP-bioluminescence technique combined with the tissue fluid contamination test and a conventional microbiological method, *International journal of food microbiology*, **20**(2), s. 109-116.

- Raspor, P. & Goranovič, D. 2008, Biotechnological applications of acetic acid bacteria, *Critical reviews in biotechnology*, **28**(2), s. 101-124.
- Rossi, F., Gaio, E. & Torriani, S. 2010, Staphylococcus aureus and Zygosaccharomyces bailii as primary microbial contaminants of a spoiled herbal food supplement and evaluation of their survival during shelf life, *Food Microbiology*, **27**(3), s. 356-362.
- Rowan, N.J., Deans, K., Anderson, J.G., Gemmell, C.G., Hunter, I.S. & Chaithong, T. 2001, Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of Bacillus spp. after growth in reconstituted infant milk formulae, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(9), s. 3873-3881.
- Ruiz-Garcia, C., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Llamas, I. & Quesada, E. 2005, Bacillus velezensis sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**(1), s. 191-195.
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P. & Bremer, P. 2016, Bacillus Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **15**(6), s. 1139-1148. DOI 10.1111/1541-4337.12231.
- Sosiaali- ja terveystoimi. 1994. *Terveystoimien ohjeet 19.8.1994/763*. Saatavilla <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1994/19940763> (Haettu 12.11.2018)
- Sosiaali- ja terveystoimi. 2000. *Asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista 461/2000*. Saatavilla: <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2000/20000461> (Haettu 12.12.2018)
- Sosiaali- ja terveystoimi. 2001. *Asetus pienten yksiköiden talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista 401/2001*. Saatavilla: <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2001/20010401> (Haettu 12.12.2018)
- Sosiaali- ja terveystoimi. 2003. *Asumisterveysohje*. Saatavilla: https://www.finlex.fi/data/normit/14951/asumisterveysohje_pdf.pdf (Haettu 30.1.2019)
- Steinberg, J.P. & Burd, E.M. 2015, 238 - *Other Gram-Negative and Gram-Variable Bacteria*, Philadelphia.
- Storgårds, E. 2000, Process hygiene control in beer production and dispensing, VTT Publications.
- Thompson, S. 2009, Microbiological spoilage of high-sugar products, teoksessa *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*, Springer, s. 301-324.
- Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S.L., Visconti, A. & Lavermicocca, P. 2008, Use of Lactobacillus plantarum fermentation products in bread-making to prevent Bacillus subtilis rosy spoilage, *International journal of food microbiology*, **122**(3), s. 328-332.
- Vaz-Moreira, I., Faria, C., Nobre, M.F., Schumann, P., Nunes, O.C. & Manaia, C. 2007, Paenibacillus humicus sp. nov., isolated from poultry litter compost, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**, s. 2267-2271

- Walker, M. & Phillips, C.A. 2008, The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice, *Food Control*, **19**(10), s. 974-981.
- Wang, L., Lee, F., Tai, C. & Kuo, H. 2008, *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**(3), s. 671-675.
- Wareing, P. & Davenport, R.R. 2005, Microbiology of soft drinks and fruit juices, *Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*, s. 279-299.
- Zhang, B., Tong, H. & Dong, X. 2005, *Pediococcus cellicola* sp. nov., a novel lactic acid coccus isolated from a distilled-spirit-fermenting cellar, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**(5), s. 2167-2170.

Liite 1. Tutkimuksessa käytetyt elatusalustat, antibiootit ja antibioottien pitoisuudet sekä liuottimet

Elatusalusta	Kasvatuslämpötila (°C)	Kasvatusaika (vrk)	Organismi
PCA	30	3	Bakteerit
MEA	20-25	4	Hiivat ja homeet
TSA	30	3	Bakteerit
WLN	30	5	Bakteerit/hiivat ja homeet
OGYE	20-25	4	Hiivat ja homeet
MAA	20-25	4	Hiivat ja homeet

Antibiootti	Elatusalusta
Kloramfenikoli/sykloheksimidi	PCA
Kloramfenikoli/sykloheksimidi	TSA
Oksitetrasykliini	OGYE

Antibiootti	Pitoisuus (mg/l)	Liuotin
Kloramfenikoli	100	96 % etanoli
Sykloheksimidi	20	96 % etanoli
Oksitetrasykliini	100	DMSO

Liite 2. Hygienianäytteiden kohteet ja menetelmät

Kohde	Menetelmä
Huuhtelukone	
Pillit	
Pullotarttumat	Pintasively pintaviijelyteknikalla PCA-, TSA- ja MEA-alustoille.
Täyttökone	Envirocheck YM-kontaktiustat
Pillit	ATP-mittaus
Pullotarttumat	
Kapseleiden luovutus-pää	
Korkit ja kapselit	Suodatus (100 ml steriiliä vettä PCA-, TSA- ja MEA-alustoille)
Tyhjät pullot	Suodatus (100 ml steriiliä vettä PCA-, TSA- ja MEA-alustoille)
Ilmanlaatu	Laskeumamatlat 1 h PCA-, TSA- ja MEA-alustoille
Tyhjien pullojen huuhteluneste	Suodatus (100 ml PCA-, TSA-, MEA- ja WLN-alustoille)
Pastörintilaitteen desinfiontiaine	Suodatus (100 ml PCA-, TSA-, MEA- ja WLN-alustoille)

Liite 3. Geenisekvenssit FASTA-muodossa

Näyte 1

```
GAGCATCTCGAaGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGAT-  
GAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAA  
CAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGC-  
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT-  
TATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC  
CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAG-  
GAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGG  
TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACT-  
GACGCTGAGGAGCGAAAGCG  
TGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC-  
TAAGTGTTAGGGGGTTTCCCCCCT  
TAGTGCACTCCTAACGCTTTAATCGCTCCGCCTGGGCAAGACCGTCTCAA-  
GAGCGTCACGTTGGCTCCAAACAGCCCCCA  
TGCTCCACCGGTTGAGCGGGGGCTTGGCCAATTT
```

Näyte 2

GATGCATCTCGAaGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGAT-
GAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGA
ACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGC-
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT-
TATTGGGCGTAAAGGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAGTTGAGTGCAGAAGAG-
GAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC-
CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGC
GTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC-
TAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCC
TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACT-
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC-
CAGGTCTTGACATCCTCTGACAATC
CTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCAT-
GGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTC-
TAAgGTGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTA-
CACACGTGCTACAATGGACAGAAAC
AAAGGGCAGCGAAACCCGCGAGGTTTAAGCCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTTCGG-
GATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGCTGGGAATCGCTAGTATCGCGGATCAGCATGCCCCGCGGTGA-
TACGTCCTGGCTGGTACACACGTCGTTCA
CACCACGAAGTGTACACCCGAGTCGGTGAGCTAACCCGTGTG

Näyte 3

GGCGCATGAGCAGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTT-
CGGGTCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAA
CGGGTGGAAGAGTAACTGCTTCCGCCATGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGC-
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAAT-
TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTTGTAAGTCCGGTGTTTAATCT
TGGGGCTCAACCCCAAGTCGCACGGGAACTGCAAGGCTTGAGTGCAGAAGAG-
GAAAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTA-
ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGC-
TAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTG
GTGCCGAAGTTAACACAATAAGCATTCGCGCTGGGGAGTACGCTCGCAA-
GAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
GCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT-
GACATCCCCCTGAATCTGCT
AGAGATAGCAGCGGCCTTCGGGACAGGGGAGACAGGTGGTGCA-
TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTA-
GAATGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTA-
CACACGTACTACAATGGCCGGTACAAC
GGGCCCCGGAAGCCGCGAGGCGGAGCCCAATCCTAAAAAGCCCGGTCTCAGTTTCGG-
GATTGCAGCTGCAACTCGGCCTG
CATGAGTCGGATTGCTAGTATCGCGGATCAGCATGGCCGCGTGATACGTCCCGGTCTGG-
TACACACGCCCCGTCCACACCA
CGAGAGTGACAACACCGAAGTTCGTGGTAACTGCAGGAGTAGTCGTGAAAGGTGGGATA

Näyte 4

GGTATGGCGAGCcTGATCCAGCATGCCGCGTGAGTGAT-
GAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCCGGGAAGATAA
TGA CTGTACCGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA-
TACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAGTCAGAGGT-
GAAAGCCTGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCTTTG
AGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTCAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATT-
CGTAGATATTCGGAAGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGGCTGACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG-
GAGCAAACAGGATTAGATAACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGA-
TAACTAGCTGTCCGGGCACTTGGTGCTTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATC
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCTGCA-
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCGTTTGACATGGTAGGACGACTTCCAGAGAT-
GGATTTCTTCCCTTCGGGGAC
CTACACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT-
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCG
CCTTTAGTTACCATCATTTGGTTGGGTACTCTAAAGGAACCGCCGGTGATAAGCCGGAG-
GAAGGTGGGGGATGACGTCAA
GTCCTCATGGCCCTTACGCGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAACTA-
CAGTGGGCAGCGACCCTGCGAGGGCGAGC
TAATCCCCAAAAGTTGTCTCAGTTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCAT-
GAAGGCGGATCGCTAGTATCGCGATCA
GCATGCCGCGTGATACGTTCCCAGCTGTACACACGCCCCGGTCACACAAT-
GGAAGTGGATCACCCGATGGCTTGCGCAACT
AGCCATAGGAGCAGCGACCACGTTGGTCACGAACTGGGGTG

Liite 4. Geenisekvenssien linjausten 10 parasta vastaavuutta

Näyte 1

Näyte 1 vastaavuudet	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Bacillus subtilis strain IAM 12118 16S ribosomal RNA, complete sequence	889	889	87 %	0.0	97 %
Bacillus tequilensis strain 10b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	87 %	0.0	97 %
Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain BGSC 3A28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	87 %	0.0	97 %
Bacillus tequilensis strain 10b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	87 %	0.0	97 %
Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain NRRL B-23049 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	87 %	0.0	97 %
Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain NRRL B-23052 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	87 %	0.0	97 %
Bacillus subtilis strain NRRL B-4219 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	87 %	0.0	97 %
Bacillus subtilis strain JCM 1465 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	87 %	0.0	97 %
Bacillus subtilis strain NBRC 13719 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	87 %	0.0	97 %
Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain NBRC 101239 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	87 %	0.0	97 %

2 (3)

Näyte 2

Näyte 2 vastaavuudet	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Bacillus velezensis strain FZB42 16S ribosomal RNA, complete sequence	1827	1827	98 %	0.0	98 %
Bacillus vallismortis strain DSM 11031 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1827	1827	98 %	0.0	98 %
Bacillus vallismortis strain NBRC 101236 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1823	1823	98 %	0.0	97 %
Bacillus nakamurai strain NRRL B-41091 16S ribosomal RNA, partial sequence	1821	1821	98 %	0.0	97 %
Bacillus amyloliquefaciens strain MPA 1034 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1821	1821	98 %	0.0	97 %
Bacillus methylophilus strain CBMB205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1821	1821	98 %	0.0	97 %
Bacillus amyloliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1821	1821	98 %	0.0	97 %
Bacillus amyloliquefaciens strain BCRC 11601 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1821	1821	98 %	0.0	97 %
Bacillus amyloliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1821	1821	98 %	0.0	97 %
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 168 16S ribosomal RNA, complete sequence	1816	1816	98 %	0.0	97 %

Näyte 3

Näyte 3 vastaavuudet	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Paenibacillus humicus strain NBRC 102415 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	95 %	0.0	97 %
Paenibacillus humicus strain PC-147 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	95 %	0.0	97 %
Paenibacillus woopenensis strain WPCB018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1731	1731	95 %	0.0	96 %
Paenibacillus herberti strain R33 16S ribosomal RNA, partial sequence	1722	1722	95 %	0.0	96 %
Paenibacillus pasadenensis strain NBRC 101214 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1707	1707	95 %	0.0	96 %
Paenibacillus pasadenensis strain SAFN-007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1683	1683	94 %	0.0	96 %
Paenibacillus xanthilyticus strain AS7 16S ribosomal RNA, partial sequence	1646	1646	98 %	0.0	94 %
Paenibacillus oenotherae strain DT7-4 16S ribosomal RNA, partial sequence	1635	1635	97 %	0.0	94 %
Paenibacillus pinihi strain S23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1635	1635	97 %	0.0	94 %
Paenibacillus beijeringensis strain 7188 16S ribosomal RNA, partial sequence	1631	1631	97 %	0.0	94 %

3 (3)

Näyte 4

Näyte 4 vastaavuudet	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Sphingomonas paucimobilis strain ATCC 29837 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1712	1712	89 %	0.0	98 %
Sphingomonas paucimobilis strain DSM 30198 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1834	1834	99 %	0.0	97 %
Sphingomonas paucimobilis strain NBRC 13935 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1834	1834	99 %	0.0	97 %
Sphingomonas pseudosanguinis strain G1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1751	1751	95 %	0.0	97 %
Sphingomonas paucimobilis strain OS-64.a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1823	1823	99 %	0.0	97 %
Sphingomonas paucimobilis strain ATCC 29837 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1794	1794	97 %	0.0	97 %
Sphingomonas sanguinis strain IFO 13937 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1729	1729	95 %	0.0	97 %
Sphingomonas paucimobilis strain IFO 13935 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1777	97 %	0.0	97 %
Sphingomonas paucimobilis strain GIFU 2395 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1799	1799	99 %	0.0	97 %
Sphingomonas sanguinis strain IFO 13937 16S ribosomal RNA, partial sequence	1700	1700	94 %	0.0	97 %